

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 18 January 1999 (18.01.99)	
<b>International application No.</b> PCT/NL98/00311	<b>Applicant's or agent's file reference</b> L/TL86/1
<b>International filing date (day/month/year)</b> 29 May 1998 (29.05.98)	<b>Priority date (day/month/year)</b> 29 May 1997 (29.05.97)
<b>Applicant</b> NIBBERING, Petrus, Hendricus et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
11 December 1998 (11.12.98)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
\_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer Dominique DELMAS</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	--

## PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference <b>L/TL86/1</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b> see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. <b>PCT/NL 98/ 00311</b>	International filing date (day/month/year) <b>29/05/1998</b>	(Earliest) Priority Date (day/month/year) <b>29/05/1997</b>
Applicant <b>RIJKSUNIVERSITEIT LEIDEN et al.</b>		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 3 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. ☐ Certain claims were found unsearchable (see Box I).
2. ☐ Unity of invention is lacking (see Box II).
3. ☐ The international application contains disclosure of a **nucleotide and/or amino acid sequence listing** and the international search was carried out on the basis of the sequence listing
- ☐ filed with the international application.
  - ☐ furnished by the applicant separately from the international application,
    - ☐ but not accompanied by a statement to the effect that it did not include matter going beyond the disclosure in the international application as filed.
  - ☐ Transcribed by this Authority
4. With regard to the title, ☐ the text is approved as submitted by the applicant
- ☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

## ANTIMICROBIAL PEPTIDES DERIVED FROM UBIQUICIDINE

5. With regard to the abstract,
- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
  - ☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this International Search Report, submit comments to this Authority.
6. The figure of the drawings to be published with the abstract is:
- Figure No. 16 ☐ as suggested by the applicant. ☐ None of the figures.
- ☒ because the applicant failed to suggest a figure.
- ☐ because this figure better characterizes the invention.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/NL 98/00311

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/11 C07K14/00 C07K14/47 G01N33/68 A61K51/08  
A61K38/04

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	K KAS ET AL.: "Genomic structure of the human fau gene: encoding the ribosomal protein S30 fused to a ubiquitin-like protein" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS., vol. 187, no. 2, 16 September 1992, pages 927-933, XP002052804 ORLANDO, FL US see the whole document --- -/--	24

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"G" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 October 1998

Date of mailing of the international search report

22/10/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/NL 98/00311

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	C A NELSON ET AL.: "Identification of the naturally processed form of hen egg white lysozyme bound to the murine major histocompatibility complex class II molecule I-Ak" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 89, no. 16, 15 August 1992, pages 7380-7383, XP002052805 WASHINGTON US see table 1	2,14,17
X	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 124, no. 23, 3 June 1996 Columbus, Ohio, US; abstract no. 314576, XP002052806 see abstract & W M RIDGWAY ET AL.: "Breaking self-tolerance in nonobese diabetic mice" J. EXP. MED., vol. 183, no. 4, 1996, pages 1657-1662,	2,14,17
X	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 5, 31 January 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 52437, G MALCHEREK ET AL.: "natural peptide ligand motifs of two HLA molecules associated with myasthenia gravis" XP002052807 see abstract & INT. IMMUNOL., vol. 5, 1993, pages 1229-1237,	2,14,17
X	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 10, 8 March 1993 Columbus, Ohio, US; abstract no. 87609, XP002052808 see abstract & JP 04 300839 A (NISSHIN FLOUR MILLING CO.) 23 October 1992	2,14,17
A	--- WO 91 16076 A (MALLINCKRODT) 31 October 1991 see the whole document -----	22,23

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/NL 98/00311

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9116076 A	31-10-1991	AT 170757 T	15-09-1998
		AU 653153 B	22-09-1994
		AU 7799891 A	11-11-1991
		CA 2080685 A	18-10-1991
		DE 69130182 D	15-10-1998
		EP 0639082 A	22-02-1995
		US 5268163 A	07-12-1993
-----			

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/NL 98/00311

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9116076 A	31-10-1991	AT 170757 T	15-09-1998
		AU 653153 B	22-09-1994
		AU 7799891 A	11-11-1991
		CA 2080685 A	18-10-1991
		DE 69130182 D	15-10-1998
		EP 0639082 A	22-02-1995
		US 5268163 A	07-12-1993

---

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

RECORD COPY

For receiving Office use only

PCT/NL 98 / 00311

International Application No.

29 MAY 1998

(29.05.98)

International Filing Date

BUREAU VOOR DE INDUSTRIËLE EIGENDOM  
P.C.T. INTERNATIONAL APPLICATION

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference  
(if desired) (12 characters maximum) L/TL86/1

Box No. I TITLE OF INVENTION

Antimicrobial peptides

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

RijksUniversiteit Leiden  
Stationsweg 46  
NL-2312 AV LEIDEN  
The Netherlands

☐ This person is also inventor.

Telephone No.

--

Facsimile No.

--

Teleprinter No.

--

State (i.e. country) of nationality:  
The Netherlands

State (i.e. country) of residence:  
The Netherlands

This person is applicant for the purposes of:

☐

all designated States

☒

all designated States except the United States of America

☐

the United States of America only

☐

the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

NIBBERING, Petrus Hendricus  
Chopinlaan 5  
NL-2215 SL VOORHOUT  
The Netherlands

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality:  
The Netherlands

State (i.e. country) of residence:  
The Netherlands

This person is applicant for the purposes of:

☐

all designated States

☐

all designated States except the United States of America

☒

the United States of America only

☐

the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒

agent

☐

common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

Van Someren, Petronella  
Francisca Hendrika Maria  
ARNOLD & SIEDSMA  
Sweelinckplein 1  
NL-2517 GK THE HAGUE  
The Netherlands

Telephone No.

+31 70 3654833

Facsimile No.

+31 70 3452140

Teleprinter No.

--

☐ Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.



## Continuation of Box N . III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS

If none of the following sub-boxes is used, this sheet is not to be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

HIEMSTRA, Pieter Sicco  
Schelling 2  
NL-2353 TE LEIDERDORP  
The Netherlands

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality:  
The Netherlands

State (i.e. country) of residence:  
The Netherlands

This person is applicant  
for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

VAN DEN BARSELAAR, Maria Theodora  
Rozevelddlaan 15  
NL-2241 NR WASSENAAR  
The Netherlands

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality:  
The Netherlands

State (i.e. country) of residence:  
The Netherlands

This person is applicant  
for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

PAUWELS, Ernest Karel Jacob  
Van Beuningenlaan 8  
NL-2334 CC LEIDEN  
The Netherlands

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality:  
The Netherlands

State (i.e. country) of residence:  
The Netherlands

This person is applicant  
for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

FEITSMA, Rolf Ide Johannes  
Kapteynstraat 43  
NL-2313 RM LEIDEN  
The Netherlands

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality:  
The Netherlands

State (i.e. country) of residence:  
The Netherlands

This person is applicant  
for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

**Box No.V DESIGNATION OF STATES**

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

**Regional Patent**

- ☒ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swaziland, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line) . . . . .

**National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):**

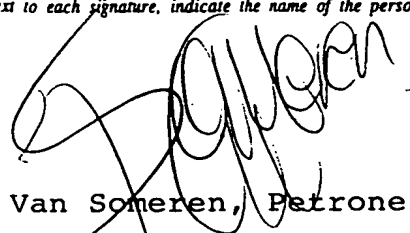
- |   |   |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AL</b> Albania . . . . .                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LT</b> Lithuania . . . . .                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AM</b> Armenia . . . . .                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LU</b> Luxembourg . . . . .                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AT</b> Austria . . . . .                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LV</b> Latvia . . . . .                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AU</b> Australia . . . . .                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MD</b> Republic of Moldova . . . . .                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AZ</b> Azerbaijan . . . . .                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MG</b> Madagascar . . . . .                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BA</b> Bosnia and Herzegovina . . . . .                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MK</b> The former Yugoslav Republic of Macedonia . . . . . |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BB</b> Barbados . . . . .                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MN</b> Mongolia . . . . .                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BG</b> Bulgaria . . . . .                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MW</b> Malawi . . . . .                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BR</b> Brazil . . . . .                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MX</b> Mexico . . . . .                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BY</b> Belarus . . . . .                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NO</b> Norway . . . . .                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CA</b> Canada . . . . .                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NZ</b> New Zealand . . . . .                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CH and LI</b> Switzerland and Liechtenstein . . . . .  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PL</b> Poland . . . . .                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CN</b> China . . . . .                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PT</b> Portugal . . . . .                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CU</b> Cuba . . . . .                                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RO</b> Romania . . . . .                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CZ</b> Czech Republic . . . . .                        | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RU</b> Russian Federation . . . . .                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DE</b> Germany . . . . .                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SD</b> Sudan . . . . .                                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DK</b> Denmark . . . . .                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SE</b> Sweden . . . . .                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>EE</b> Estonia . . . . .                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SG</b> Singapore . . . . .                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ES</b> Spain . . . . .                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SI</b> Slovenia . . . . .                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>FI</b> Finland . . . . .                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SK</b> Slovakia . . . . .                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GB</b> United Kingdom . . . . .                        | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SL</b> Sierra Leone . . . . .                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GE</b> Georgia . . . . .                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TJ</b> Tajikistan . . . . .                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GH</b> Ghana . . . . .                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TM</b> Turkmenistan . . . . .                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GM</b> Gambia . . . . .                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TR</b> Turkey . . . . .                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GW</b> Guinea-Bissau . . . . .                         | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TT</b> Trinidad and Tobago . . . . .                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HU</b> Hungary . . . . .                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UA</b> Ukraine . . . . .                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ID</b> Indonesia . . . . .                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UG</b> Uganda . . . . .                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IL</b> Israel . . . . .                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>US</b> United States of America . . . . .                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IS</b> Iceland . . . . .                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UZ</b> Uzbekistan . . . . .                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>JP</b> Japan . . . . .                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>VN</b> Viet Nam . . . . .                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KE</b> Kenya . . . . .                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>YU</b> Yugoslavia . . . . .                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KG</b> Kyrgyzstan . . . . .                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZW</b> Zimbabwe . . . . .                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KP</b> Democratic People's Republic of Korea . . . . . |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KR</b> Republic of Korea . . . . .                     |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KZ</b> Kazakhstan . . . . .                            |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LC</b> Saint Lucia . . . . .                           |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LK</b> Sri Lanka . . . . .                             |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LR</b> Liberia . . . . .                               |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LS</b> Lesotho . . . . .                               |   |

Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

- ☐ . . . . .
- ☐ . . . . .
- ☐ . . . . .

In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except the designation(s) of . . . . .

The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

<b>Box N . VI PRIORITY CLAIM</b>		Further priority claims are indicated in the Supplemental Box <input type="checkbox"/>	
The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:			
Country (in which, or for which, the application was filed)	Filing Date (day/month/year)	Application No.	Office of filing (only for regional or international application)
item (1) The Netherlands	(29.05.97) 29 May 1997	1006164	
item (2)			
item (3)			
Mark the following check-box if the certified copy of the earlier application is to be issued by the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office (a fee may be required):			
<input checked="" type="checkbox"/> The receiving Office is hereby requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s): (1)			
<b>Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY</b>			
Choice of International Searching Authority (ISA) (If two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used): ISA / EPO			
Earlier search Fill in where a search (international, international-type or other) by the International Searching Authority has already been carried out or requested and the Authority is now requested to base the international search, to the extent possible, on the results of that earlier search. Identify such search or request either by reference to the relevant application (or the translation thereof) or by reference to the search request.			
Country (or regional Office):	Date (day/month/year):	Number:	
The Netherlands	21 January 1998	SN 29399 NL	
<b>Box No. VIII CHECK LIST</b>			
This international application contains the following number of sheets:		This international application is accompanied by the item(s) marked below:	
1. request : 4 sheets		1. <input type="checkbox"/> separate signed power of attorney	5. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet
2. description : 24 sheets		2. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney	6. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganisms
3. claims : 4 sheets		3. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature	7. <input type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing (diskette)
4. abstract : 1 sheets		4. <input checked="" type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): 1	8. <input type="checkbox"/> other (specify):
5. drawings : 17 sheets			
<b>Total : 50 sheets</b>			
Figure No. _____ of the drawings (if any) should accompany the abstract when it is published.			
<b>Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT</b>			
Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).			
 Van Someren, Petronella Francisca Hendrika Maria			

For receiving Office use only		2. Drawings: <input checked="" type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received:
1. Date of actual receipt of the purported international application:	29 MAY 1998 (29.05.98)	
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		
5. International Searching Authority specified by the applicant: ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

For International Bureau use only	
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:	01 JULY 1998 (01.07.98)

## ANTIMICROBIËLE PEPTIDEN

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op het nieuwe medische gebruik van een op zichzelf bekend peptide, dat in deze aanvraag "ubiquicidine" genoemd zal worden. De uitvinding betreft verder nieuwe van dit  
5 peptide afgeleide peptidenfragmenten, eventueel in gemo-  
dificeerde vorm of voorzien van een (radioactief) label,  
en het gebruik hiervan in profylaxe, therapie en diagnos-  
tiek van infecties in mens en dier. Ook heeft de uitvin-  
ding betrekking op nieuwe antimicrobiële en diagnostische  
10 middelen op basis van het peptide, de peptidenfragmenten  
en/of gemodificeerde versies daarvan, eventueel in de  
vorm van combinatiepreparaten. Tenslotte verschaft de  
uitvinding nog een nieuwe methode voor het vervaardigen  
van van een radioactief label voorziene peptiden met  
15 antimicrobiële activiteit.

Het gebruik van wat "klassieke" antibiotica genoemd worden is in steeds meer gevallen niet afdoende voor het behandelen van infectieziekten. Vele bacterie-  
stammen hebben resistentie tegen de bekende klassen  
20 antibiotica verworven en in de laatste dertig jaar zijn  
er geen nieuwe klassen antibiotica meer ontdekt. Tegen  
Mycobacteriën bestaan weinig of geen afdoende middelen.  
En ook andere micro-organismen, zoals fungi, en bepaalde  
parasieten zijn soms moeilijk te behandelen met bestaande  
25 antimicrobiële middelen. Gezien het bovenstaande is een  
nieuwe klasse van antimicrobiële middelen zeer gewenst.

Momenteel hebben twee nieuwe typen antimicrobi-  
ele middelen de aandacht. Enerzijds zijn dat de koolhy-  
draatachtige agentia. Daarnaast richt het onderzoek zich  
30 op peptiden, met name (kationische) peptiden, met antimi-  
crobiële activiteit. Kationische peptiden bevatten rela-  
tief veel positief geladen aminozuren, zoals arginine en  
lysine, en dragen daardoor een netto positieve lading,  
meestal van tenminste +2, maar vaak +4 of meer. Antimi-  
35 crobiële peptiden zijn een belangrijke component van de  
natuurlijke afweer van de meeste levende organismen tegen  
infecties. Veel van dergelijke antimicrobiële peptiden  
zijn kationisch. Bij de mens en andere zoogdieren zijn

dergelijke peptiden, zoals de defensines, een belangrijk eiwitachtig bestanddeel van bijvoorbeeld neutrofiele granulocyten. Deze cellen zijn reeds in een zeer vroeg stadium betrokken bij de afweer tegen micro-organismen en  
5 bij acute ontstekingsreacties. Daarnaast worden dergelijke peptiden ook door vele andere cellen, waaronder epitelcellen, die strategisch zijn gelokaliseerd ten opzichte van binnendringende micro-organismen, geproduceerd.

10 In het onderzoek dat leidde tot de onderhavige uitvinding werd gevonden dat het op zichzelf bekende peptide FAU S30 (dat thans door de onderhavige uitvinders "ubiquicidine" genoemd wordt) antimicrobiële werking heeft. Verder werd gevonden dat van dit peptide afgeleide  
15 peptiden(fragmenten) eveneens in meer of mindere mate een antimicrobiële werking hebben. Deze peptiden(fragmenten) als zodanig zijn niet eerder beschreven en derhalve nog nieuw.

Op basis van deze vaststelling verschaft de  
20 onderhavige uitvinding het gebruik van ubiquicidine of daarvan afgeleide, eventueel gemodificeerde peptiden(fragmenten) voor de vervaardiging van een medicament voor de behandeling, diagnostiek of profylaxe van infecties in mens en dier.

25 Het voordeel van ubiquicidine en fragmenten daarvan is dat zij niet slechts een antimicrobiële en immunomodulerende werking hebben, maar dat zij zich in het lichaam tevens gericht naar de daadwerkelijke plaats van infectie begeven en aldaar accumuleren. Deze pepti-  
30 den(fragmenten) zijn derhalve infectiezoekend.

Met "antimicrobiële werking" wordt in deze aanvraag ieder remmend of anderszins negatief effect op bacteriën, virussen, protozoa, parasieten en schimmels bedoeld.

35 Met immunomodulerende werking wordt in deze aanvraag ieder stimulerend effect op lichaamscellen van mens en/of dier betrokken bij de afweer tegen infecties bedoeld.

Met "ubiquicidine" wordt in deze aanvraag bedoeld een peptide van 6,654 kD met een aminozuursequentie, zoals weergegeven in figuur 1.

Van ubiquicidine afgeleide peptidenfragmenten  
5 omvatten een bij voorkeur aaneengesloten reeks van tenminste 3, bij voorkeur tenminste 8 aminozuren uit de aminozuursequentie van ubiquicidine zoals getoond in figuur 1. Voor een gemiddelde deskundige is het eenvoudig vast te stellen of een peptidenfragment met een uit de  
10 aminozuursequentie van ubiquicidine gekozen reeks bij voorkeur aaneengesloten aminozuren ook daadwerkelijk antimicrobiële activiteit heeft en zo voldoet aan de uitvinding. Een eenvoudige standaardtest voor bepaling van antimicrobiële activiteit is bijvoorbeeld de alom bekende  
15 groei-killingstest, ofwel bepaling van de concentratie van een antimicrobieel middel dat 99% van de micro-organismen doodt (IC 99%). Met "peptiden(fragmenten)" worden in deze aanvraag derhalve aangeduid alle aminozuurketens, die kleiner zijn dan het ubiquicidine  
20 zelf, maar waarvan de aminozuursequentie wel bij voorkeur aaneengesloten is terug te vinden in het ubiquicidine. De lengte van dergelijke peptiden(fragmenten) kan variëren van 3 tot 58 aminozuren, waarbij eventuele extra aminozuren, die als modificatie worden toegevoegd, niet zijn  
25 meegenomen.

Voorbeelden van peptiden(fragmenten) zijn de peptiden waarvan de sequentie is weergegeven in figuur 1. Ubiquicidine (18-35)-D-alanine heeft als extra toevoeging een D-alanine aan beide uiteinden. Van de in figuur 1  
30 getoonde peptidenfragmenten hebben ubiquicidine (1-18), ubiquicidine (18-35) en ubiquicidine (29-41) de bijzondere voorkeur. In de bovenbeschreven test ligt de activiteit van deze fragmenten rond 1  $\mu$ M. Dit is een bijzonder goede antimicrobiële activiteit. Echter, in beginsel  
35 vallen alle boven gedefinieerde peptiden, die een of andere remmende werking op micro-organismen vertonen, binnen de uitvinding. Peptiden met een IC 99% van maxi-

maal 25  $\mu\text{M}$ , bij voorkeur maximaal 10  $\mu\text{M}$ , meest bij voorkeur maximaal 1  $\mu\text{M}$  hebben echter de voorkeur.

Om hun activiteit te modificeren, bijvoorbeeld om deze nog verder te verhogen, of om afbraak door enzymen, met name peptidasen, te remmen of tegen te gaan, kunnen zowel het peptide (ubiquicidine) als de fragmenten op verschillende manieren gemodificeerd worden. Modificatie is elke afwijking van de van nature voorkomende aminozuurketen. Modificaties kunnen zijn het in tegengestelde volgorde aan elkaar koppelen van tenminste een deel van de aminozuren van het peptide of een peptidenfragment. Wanneer alle aminozuren van een peptiden(fragment) zo zijn omgekeerd spreekt men van een "reverse peptide(fragment)".

Ook kunnen een of meer van de aminozuren uit het oorspronkelijke peptiden(fragment) vervangen zijn door een stereoisomeer van dat aminozuur. In het lichaam komen de L-isomeren van aminozuren voor. De D-stereoisomeren kunnen veel minder gemakkelijk door in het lichaam aanwezige en bacteriële enzymen worden afgebroken. Een dergelijke modificatie zorgt ervoor dat het peptiden(fragment) in het lichaam langer intact blijft en zijn werking langer kan uitoefenen. Een soortgelijke modificatie bestaat uit het uitbreiden van de oorspronkelijke aminozuurketen aan een of beide uiteinden met een of meer tegen afbraak beschermende groepen, zoals D-aminozuren, bijvoorbeeld D-alanine.

Alle op de hierboven beschreven wijze gemodificeerde of op andere wijze van het overeenkomende natieve peptiden(fragment) afwijkende aminozuurketens zullen in deze aanvraag worden aangeduid met de term "afgeleide". Dit kunnen zowel afgeleiden van het ubiquicidine als van fragmenten daarvan zijn.

De uitvinding betreft verder zogeheten "hybridenmoleculen", welke een (kationische) peptide met een antimicrobiële werking en/of een peptidenfragment en/of een afgeleide daarvan volgens de uitvinding omvatten samen met een of meer effectormoleculen. Het effectormo-

lecuul kan verschillende vormen aannemen, zoals een aminozuurketen, die in staat is te binden aan een micro-organisme en/of door micro-organismen uitgescheiden of op het oppervlak daarvan tot expressie gebrachte stoffen.

- 5 Een voorbeeld van een dergelijk effectormolecuul is een endotoxinebindend peptide.

Een ander type effectormolecuul kan bestaan uit een viruseiwit. Een dergelijk viruseiwit-antimicrobieel peptide kan de gastheercel, waarin het te bestrijden  
10 micro-organisme zich bevindt, op de van een virus bekende wijze binnengaan en daarin kan het peptide zijn antimicrobiële werking uitoefenen.

Het effectormolecuul kan verder een detecteerbaar label zijn, zoals een radionuclide, gekozen uit de  
15 groep bestaande uit technetium 99m (Tc-99m), jood 123 (I-123) en 131 (I-131), broom 75 (B-75) en 76 (B-76), lood 203 (Pb-203), gallium 67 (Ga-67) en 68 (Ga-68), arseen 72 (As-72), indium 111 (In-111), 113m (In-113m) en 114m (In-114m), ruthenium 97 (Ru-97), koper 62 (Cu-62), 64  
20 (Cu-64) en 67 (Cu-67), ijzer 52 (Fe-52), mangaan 52m (Mn-52m), chroom 51 (Cr-51), renium 186 (Re-186) en 188 (Re-188), terbium 161 (Tb-161) en Yttrium 90 (Y-90). Het radionuclide (ook wel "straler" genoemd) kan tevens een curatieve functie vervullen. Ook paramagnetische labels,  
25 zoals fluor 19 (F-19), natrium 23 (Na-23), fosfor 31 (P-31), gadolinium 157 (Gd-157), mangaan 55 (Mn-55), dysprosium 162 (Dy-162), chroom 52 (Cr-52) en ijzer 56 (Fe-56) kunnen worden gebruikt.

Volgens de uitvinding kunnen eveneens combina-  
30 ties van effectormoleculen aan het peptide gekoppeld zijn. Een voorbeeld daarvan zijn een celbindend peptide en een straler, waarbij het celbindende peptide en het antimicrobiële peptide zorgen voor een sturing van het hybridenmolecuul naar de plaats van infectie en het anti-  
35 microbiële peptide en de straler voor behandeling of diagnose.

Hybridenmoleculen van dit type, welke bestaan uit een antimicrobieel peptide, peptidenfragment of afge-



leide daarvan en tenminste een effectormolecuul zijn niet eerder beschreven. De "hybridenmoleculen" volgens de uitvinding beperken zich derhalve niet tot het ubiquicidine als antimicrobieel peptide, maar omvatten in het  
5 algemeen hybridenmoleculen welke een (kationische) peptide met antimicrobiële activiteit en/of fragmenten en/of afgeleiden daarvan omvatten. Voorbeelden van andere van dergelijke antimicrobiële peptiden zijn  $\alpha$ - en  $\beta$ -defensines, protegrines, serprocidines, magainines, PR-39,  
10 cecropines en andere (Martin et al. (1995) J. Leukocyte Biol. 58:128-136).

De uitvinding heeft betrekking op de hierboven uitgebreid beschreven varianten van het peptide of fragmenten daarvan. Deze varianten alsmede het peptide en de  
15 fragmenten kunnen in deze aanvraag tevens gezamenlijk zijn aangeduid als "peptiden(fragmenten)".

De uitvinding betreft verder een antimicrobieel middel, omvattende als actieve component ubiquicidine en/of peptidenfragmenten daarvan, afgeleiden van een van  
20 beiden en/of hybridenmoleculen, die tenminste ubiquicidine of andere antimicrobiële kationische peptiden, en/of peptidenfragmenten daarvan en/of afgeleiden daarvan bevatten voor gebruik in de diagnostiek, profylaxe, monitoring of therapie van infecties.

25 Het antimicrobiële middel volgens de uitvinding kan slechts de actieve component bevatten of de vorm hebben van een farmaceutische samenstelling, waarin een of meer andere dragers, verdunningsmiddelen en dergelijke aanwezig zijn. Het middel en de samenstelling kunnen  
30 verschillende toedieningsvormen hebben, zoals bijvoorbeeld tablet, pil, capsule, injectie, infuus, zetpil, poeder, suspensie, oplossing, spray, emulsie, zalf, aërosol, pleister of crème en kunnen gebruikt worden voor orale, anale, nasale, vaginale, intramusculaire, subcuta-  
35 ne, intraveneuze, intraperitoneale of lokale (topische) toediening of toediening door middel van een katheter via natuurlijke of kunstmatige lichaamsopeningen. Zeer specifieke andere voorbeelden van toedieningsvormen zijn

tandpasta, tandvernis en met de actieve verbinding gecoate katheters. Deze laatste hebben een profylactische werking.

Samenstellingen volgens de uitvinding kunnen  
5 bereid worden door het combineren (d.w.z. mengen, oplossen etc.) van de actieve component(en) met farmaceutisch en farmacologisch acceptabele excipienten met een neutraal karakter (zoals waterige of niet-waterige oplosmiddelen, stabilisatoren, emulgatoren, detergentia,  
10 additieven), en verder indien noodzakelijk kleur-, geuren/of smaakstoffen. De concentratie van het (de) actieve component(en) in een farmaceutische samenstelling kan variëren tussen 0,001% and 100% (g/v), afhankelijk van de aard van de behandeling en de wijze van toedienen. De toe  
15 te dienen dosis hangt eveneens af van de wijze van toediening en aard van de behandeling. Voor de muis is bijvoorbeeld een dosis van 1 tot 10 µg/kg, bijvoorbeeld 4 µg/kg lichaamsgewicht geschikt. De samenstellingen volgens de uitvinding zijn geschikt voor behandeling van  
20 zowel mens als dier.

De uitvinding heeft verder betrekking op het ubiquicidine, op peptidenfragmenten daarvan, op afgeleiden van een van beiden en op hybridenmoleculen, die tenminste ubiquicidine of andere antimicrobiële kationische  
25 peptiden, en/of peptidenfragmenten daarvan en/of afgeleiden daarvan bevatten voor gebruik in diagnostiek, profylaxe, therapie of monitoring van infecties.

Infecties, die met het middel behandeld kunnen worden, zijn bijvoorbeeld aandoeningen veroorzaakt door  
30 pathogene Gram-positieve (Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes inclusief antibiotica-resistente stammen van S.aureus (ook wel Multidrug-Resistent S.aureus (MRSA) genoemd)) en Gram-negatieve ((antibioticum-resistente) Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, enterococcen en  
35 Salmonella typhimurium) bacteriën, moeilijk te behandelen micro-organismen, zoals Mycobacterium avium en Mycobacterium fortuitum, fungi (schimmels), zoals Candida albicans, Cryptococcus neoformans en Aspergillus fumiga-

tis, virussen, in het bijzonder envelopvirussen, en parasieten, zoals Trypanosoma cruzi en Toxoplasma gondii. Het gebruik van het middel is echter niet tot de hier genoemde infecties beperkt.

5 Doordat het peptiden(fragment) volgens de uitvinding infectiezoekend is kan het zeer goed worden toegepast in de diagnostiek van infecties en daarmee gerelateerde pathologie. Indien voorzien van een detecteerbaar label, bijvoorbeeld een radioactief label, zoals  
10 technetium 99m, kan na verloop van tijd na toediening bijvoorbeeld door middel van scintigrafie worden bepaald waar in het lichaam zich het peptiden(fragment) bevindt. Dit zal tevens de plaats zijn waar zich de te behandelen infectie bevindt. Een dergelijk gelabeld peptiden(frag-  
15 ment) heeft derhalve een tweeledig doel. Niet slechts wordt aangetoond waar de infectie zich bevindt, maar tevens zal het peptiden(fragment) door zijn aanwezigheid ter plaatse een antibiotische werking uitoefenen en zo de infectie verminderen. Op deze wijze kan ook het effect  
20 van de behandeling worden gevolgd door in de tijd de lokalisatie van het peptide te bekijken. Dit wordt "monitoring" genoemd.

In beginsel kan elk van de hierboven genoemde radionucliden gebruikt worden. De bijzondere voorkeur  
25 gaat echter uit naar technetium 99m (<sup>99m</sup>Tc). De fysische halveringstijd van dit radionuclide bedraagt 6 uur en tezamen met het feit dat vooral gamma-straling wordt uitgezonden betekent dit voor de patiënt een geringe stralenbelasting. De relatief geringe halveringstijd  
30 heeft bovendien het klinische voordeel dat het onderzoek snel kan worden herhaald. Verder is dit radionuclide eenvoudig beschikbaar via de commercieel verkrijgbare Mo-Tc-nuclide-generator.

Met technetium 99m gelabelde peptiden(fragmen-  
35 ten) blijken reeds na 15 minuten ter plaatse van de infectie gedetecteerd te kunnen worden. De accumulatie van bijvoorbeeld gallium 67 duurt tenminste 24 uur. Door de zeer snelle lokalisatie van met technetium 99m gela-

belde peptiden(fragmenten) is een snelle diagnose mogelijk. Bovendien is technetium 99m voornamelijk een  $\gamma$ -straler met een zeer geringe hoeveelheid van de veel schadelijkere  $\beta$ -straling, zodat er een relatief lage stralingsbelasting voor de patiënt bestaat. Hierdoor is een frequentere toediening mogelijk. Daarnaast is nog gebleken dat labeling met technetium 99m geen nadelige invloed heeft op de werking van het peptiden(fragment). Bij proefdierexperimenten werden tot nu toe geen nadelige effecten, c.q. veranderde uiterlijke kenmerken van met  $^{99m}\text{Tc}$  gelabelde peptiden(fragmenten) op de dieren gevonden. Bovendien hebben in vitro studies aangetoond dat zeer hoge concentraties van de antimicrobiële peptiden(fragmenten) niet toxisch zijn voor menselijke lichaamscellen. De bijzondere voorkeur gaat volgens de uitvinding derhalve uit naar met technetium 99m gelabelde kationische peptiden en fragmenten of afgeleiden daarvan als hybridemoleculen.

De peptiden(fragmenten) volgens de onderhavige uitvinding tonen de infectie zelf aan en dus de plaats waar het micro-organisme zich in het lichaam bevindt. Bekende beeldvormende methoden voor het opsporen van infecties, zoals röntgen, echografie en dergelijke, zijn gericht op het aantonen van morfologische veranderingen, die het gevolg zijn van een infectie. Het is echter zeer wel mogelijk dat de infectie zelf reeds verdwenen is, terwijl de morfologische verandering nog bestaat. In dat geval wordt de behandeling van de infectie met bijvoorbeeld antibiotica gewoon doorgezet, terwijl deze eigenlijk niet meer nodig is. In beginsel heeft het de voorkeur om een behandeling met een bepaald antimicrobieel middel zo kortdurend als mogelijk te laten zijn in verband met het ontstaan van resistenties of allergieën als gevolg van het middel. De peptiden(fragmenten) volgens de uitvinding zijn infectiezoekend en komen derhalve op de plaats van de infectie zelf terecht en kunnen daar ook zichtbaar gemaakt worden. Zodra de infectie verdwenen is blijkt dit uit het feit dat het peptiden(fragment) niet

langer ter plaatse van de (voormalige) infectie accumuleert. De behandeling kan dan gestopt worden. Met behulp van gelabelde peptiden kunnen infecties worden onderscheiden van ontstekingsprocessen. Infecties treden op  
5 wanneer het lichaam reageert op de aanwezigheid van een lichaamsvreemd levend organisme. "Ontsteking" is een algemene benaming van reacties van het lichaam op lichaamsvreemde prikkels, zoals deeltjes, moleculen, maar ook levende bacteriën. Het peptide reageert alleen bij  
10 infecties.

Verder betreft de uitvinding combinatiepreparaten, welke naast ubiquicidine en/of een peptidenfragment daarvan en/of een afgeleide daarvan en/of een hybridenmolecuul een of meer andere actieve componenten bevatten.  
15 Te denken valt bijvoorbeeld aan combinaties met "klassieke" antibiotica of met antivirale of antifungale middelen.

De uitvinding heeft verder betrekking op een werkwijze voor het labelen van antimicrobiële peptiden,  
20 in het bijzonder kationische peptiden, meer in het bijzonder ubiquicidine en daarvan afgeleide peptiden en defensines. Een dergelijke werkwijze omvat het in contact brengen van het te labelen peptide met een tin(II)-zout, een boorhydride en een radioactief label in de aanwezigheid van loog, zoals beschreven in Pauwels et al. (Nucl.  
25 Med. Biol. 20, 825-833 (1993)), maar waarbij het peptide gemodificeerd is met MAG3 (mercaptoacetyl glycine-glycine-glycine). Het gemodificeerde peptide wordt voorafgaand aan de labeling gedurende 10 minuten bij ongeveer 100°C  
30 gehouden. In het bijzonder in geval van kleine peptiden of peptiden, die geen zwavelgroepen dragen, leidt de MAG3-modificatie tot aanzienlijk hogere labelingsefficiënties.

Het geheel wordt gedurende een bepaalde tijd,  
35 bijvoorbeeld van 1 tot 60 minuten, bij voorkeur 5 to 30 minuten geroerd bij een geschikte temperatuur. De temperatuur hangt af van de temperatuurgevoeligheid van het

peptide, maar zal meestal tussen kamertemperatuur en 40°C liggen, en bij voorkeur ongeveer 37°C zijn.

Het tin(II)-zout is bij voorkeur tin(II)pyrofosfaat. Het boorhydride is bij voorkeur natriumboorhydride of kaliumboorhydride. Het tin(II)-zout en het boorhydride worden voordeligerwijze gebruikt in een verhouding tussen 1:1 en 1:10, bij voorkeur 1:4 in hoeveelheden van respectievelijk 0.5-5 µl en 2-10 µl. Bij voorkeur wordt als loog 0.1 M natronloog gebruikt.

10 Het radioactieve label is met voordeel <sup>99m</sup>Tc-pertechneetaat, maar ook <sup>186</sup>Re-perrenaat kan worden gebruikt. Van dergelijke radioactieve labels worden standaardoplossingen in de handel gebracht. In de werkwijze volgens de uitvinding wordt van een dergelijke oplossing  
15 0,05-0,5 ml, bij voorkeur 0,1 ml gebruikt.

Een bijzonder voordelige manier voor het vervaardigen van ubiquicidine, en eventueel de fragmenten, afgeleiden en hybridenmoleculen is door middel van transgene dieren. De werkwijze omvat daartoe het transformeren van een dierlijke eicel met een genconstruct dat codeert voor het ubiquicidine, peptidenfragment, afgeleide of hybridenmolecuul, het uit de getransformeerde eicel regenereren van een transgeen dier en het uit een weefsel of lichaamsvloeistof van het dier, bijvoorbeeld melk, isoleren van het ubiquicidine, peptidenfragment, afgeleide of hybridenmolecuul. Uiteraard kunnen de producten ook gesynthetiseerd worden.

De onderhavige uitvinding zal verder worden verduidelijkt aan de hand van de begeleidende voorbeelden, die slechts gegeven zijn ter illustratie, maar de uitvinding niet beperken. In de voorbeelden wordt verwezen naar de volgende figuren waarin tonen:

Figuur 1 Aminozuurvolgorde van ubiquicidine en afgeleide peptiden

35 Figuur 2 Antimicrobieel effect van ubiquicidine ten aanzien van Klebsiella pneumoniae en Staphylococcus aureus

- Figuur 3 Effect van ubiquicidine (18-35) op herpes simplex-virusinfectie van Vero-cellen
- Figuur 4 Effect van ubiquicidine (18-35) op *Mycobacterium fortuitum*
- 5 Figuur 5 Effect van ubiquicidine (18-35) en ubiquicidine (18-29) op (antibioticum-resistente) Staphylococcus aureus
- Figuur 6 Effect van ubiquicidine (18-35) en D-alanine-beschermd ubiquicidine (18-35) op Klebsiella pneumoniae
- 10 Figuur 7 Snelheid van ubiquicidine (18-35) en D-alanine-beschermd ubiquicidine (18-35) waarmee Staphylococcus aureus wordt geëlimineerd
- Figuur 8 Effect van ubiquicidine (18-35) en D-alanine-beschermd ubiquicidine (18-35) op (antibioticum-resistente) Staphylococcus aureus
- 15 Figuur 9 Effect van D-alanine-beschermd ubiquicidine (18-35) op (antibioticum-resistente) Escherichia coli
- 20 Figuur 10 Scintigram van intraperitoneaal toegediende <sup>99m</sup>-technetium-gelabelde ubiquicidine (18-35) in Staphylococcus aureus-geïnfecteerde muis
- Figuur 11 Schematische weergave van de experimentele infectie en behandeling van muizen
- 25 Figuur 12 Accumulatie van <sup>99m</sup>technetium-gelabelde ubiquicidine (18-35), ubiquicidine (1-18), defensines en humaan IgG in de Klebsiella pneumoniae-geïnfecteerde dijspier
- Figuur 13 Accumulatie van <sup>99m</sup>Tc-gelabeld ubiquicidine 18-35 in een infectiehaard maar niet in ontstekingen
- 30 Figuur 14 Effect van ubiquicidine (18-35), ubiquicidine (1-18) en defensines op een experimentele infectie met Staphylococcus aureus en Escherichia coli
- 35 Figuur 15 Antimicrobieel effect van ubiquicidine 29-41 en 18-35 en defensine-1 in muizen

**VOORBEELDEN****VOORBEELD 1****Antimicrobiële werking van ubiquicidine****1. Inleiding**

5 Door middel van gelfiltratie en reverse phase HPLC werd een peptide geïsoleerd uit de cytosol-fractie van met interferon- $\gamma$  geactiveerde RAW 264.7 macrofagen van de muis en op verschillende manieren gestimuleerde cellen van de humane H292 luchtwegepitheelcellijn. Deze  
10 laatste konden worden gestimuleerd met bacteriële producten (endotoxine, lipoteichoïnezuur), forbolester, en luchtwegpathogenen (Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae en parainfluenza virus 3). Het geïsoleerde peptide werd ubiquicidine genoemd.

15

**2. Materialen en methode****2.1. Isolatie van ubiquicidine**

De methode om ubiquicidine te isoleren uit cytosolfracties van cellen werd eerder beschreven voor de  
20 isolatie van antimicrobiële eiwitten uit cellysaten en celmembraanfracties (Hiemstra et al. (1993) Infect.Immun. 61:3038-3046). De cellen werden gekweekt in RPMI 1640 medium met antibiotica en 10% hitte-geïnactiveerd foetaal kalfsserum. Vervolgens werden de cellen geoogst, gewassen  
25 en opgenomen in 10 mM natriumfosfaatbuffer (pH 7,4) verrijkt met een cocktail van proteaseremmers.

Met behulp van stikstofcavitatie werd een cellysaat verkregen waarna door middel van ultracentrifugering met 27.000xg een membraanfractie en een cytosol-  
30 fractie werden verkregen. De eiwitten in de cytosolfractie werden geëxtraheerd met behulp van 5% azijnzuur en het zure extract werd gedialyseerd en vervolgens op een P60 kolom gebracht.

De fracties afkomstig van deze kolom werden  
35 onderzocht op antimicrobiële activiteit. De ubiquicidine-bevattende fracties werden gepoold en door middel van HPLC verder gescheiden op een C18 kolom met heptafluorboterzuur als "ion pairing molecule" in het eluens. De



HPLC-fracties werden eveneens onderzocht op antimicrobiële activiteit en immunoreactiviteit met behulp van een antiserum tegen het N-terminale deel van het ubiquicidine. De gepoolde fracties bevatten zuiver ubiquicidine.

5

## 2.2. Biochemische karakterisering

De volgorde van de N-terminale aminozuren van gezuiverd ubiquicidine werd bepaald door middel van geautomatiseerde Edman-degradatie en een peptidensequencer 477A uitgerust met een PTH-aminozuuranalysator 120A (Applied Biosystems, Foster City, CA). De sequentieresultaten werden vervolgens met behulp van het GeneWorks-pakket (Intelligenetics, Mountain View, CA) geanalyseerd. Molecuulgewicht van ubiquicidine werd met behulp van massaspectrometrie (laser desorption time-of-flight massaspectrometry; Lasermat, Finnigan MAT LTD, Hemel Hempstead, UK) bepaald. Voor de immunologische identificatie van ubiquicidine werd gebruik gemaakt van een konijn-antiserum specifiek voor het N-terminale deel van ubiquicidine (ubiquicidine 1-18) en Western blotting.

## 2.3. Testen van antimicrobiële activiteit in vitro

Voor het onderzoek naar de antimicrobiële activiteit van ubiquicidine en hiervan afgeleide peptiden werden verschillende technieken gebruikt. De gel-overlaybepaling en de radiale diffusiebepaling zijn eerder beschreven (Hiemstra et al. (Infect. Immun. 63, 3038-3046 (1993))). In de groei-killingscurvebepaling, welke gebruikt werd om de IC 99% van het peptide te onderzoeken, worden (mid-log of stationaire fase) bacteriën (Klebsiella pneumoniae (A) en Staphylococcus aureus (B) gedurende 60 minuten bij 37°C aan oplopende concentraties van het ubiquicidine blootgesteld, waarna het aantal levende bacteriën in de suspensie bepaald wordt met behulp van microbiologische plaattechnieken (Colony Forming Units, CFU). Als negatieve controles werden bacteriën blootgesteld aan peptide 4 (een synthetisch peptide afgeleid van

35

HIV glycoproteïne 120), ubiquidine (18-29) of geen peptide.

De resultaten van dergelijke experimenten worden in CFU's weergegeven in Figuur 2.

5

### 3. Resultaat

Het ubiquidine is een 6,7 kD ribosomaal kationisch peptide met een pI van 12,67. Uit sequentiebe-  
paling van de 18 N-terminale aminozuren van het geïso-  
10 leerde peptide bleek dat deze volledig overeenkwamen met het N-terminale deel van het S30 deel van het expressie-  
product van het Finkel-Biskis-Reilly muis-sarcoma geasso-  
cieerde ubiquitair tot expressie gebrachte (FAU) gen dat  
15 molecuulgewicht van het FAU S30 en het ubiquidine bleek  
overeen te komen. Derhalve wordt ervan uitgegaan dat het  
hier hetzelfde peptide betreft.

Uit de bepaling van de antimicrobiële werking  
in vitro van ubiquidine bleek dat het ubiquidine zeer  
20 snel (< 10 minuten) verschillende micro-organismen effec-  
tief (3-4 logreductie) kan doden. Figuur 2 toont mid-log  
Klebsiella pneumoniae (A) en Staphylococcus aureus (B),  
welke gedurende 60 minuten bij 37°C aan oplopende concen-  
traties gezuiverd ubiquidine in 10 mM natriumfosfaat-  
25 buffer waren blootgesteld. In de controle-incubaties  
vermenigvuldigden de bacteriën zich enige malen (niet  
getoond). De minimale remmende concentratie voor genoemde  
micro-organismen bleek tussen de 0,08 en de 0,16  $\mu$ M te  
liggen, 1,5  $\mu$ M ubiquidine elimineert Klebsiella pneumo-  
30 niae (A) bijna volledig, terwijl de reductie in het  
aantal Staphylococcus aureus (B) 2-log bedraagt.

## VOORBEELD 2

### Antimicrobiële werking van peptidenfragmenten

#### 35 1. Inleiding

Van het natieve ubiquidine werd een aantal peptidenfragmenten afgeleid en de antimicrobiële activi-  
teit daarvan bepaald.

## 2. Materialen en methoden

### 2.1. Productie synthetische peptiden

Peptiden werden met behulp van een Abimed AMS multiple peptide synthesizer en een vaste fase (tentagel  
5 AC, een polymeer van polyethyleenglycolspacer gekoppeld  
aan een polystyreenmatrix) vervaardigd (de Koster et al.  
(1995) J. Immunol. Methods 187:179-188). Na voltooiing  
van de synthese werd het peptide van de vaste fase losge-  
koppeld met behulp van een trifluorazijnzuur-water(19:1)-  
10 mengsel en vervolgens werden de peptiden geprecipiteerd  
met een ether-pentaaan(1:1)-mengsel bij 20°C. Na centrifu-  
gering werden de verkregen peptiden gedroogd bij 40°C  
gedurende 15 minuten. Vervolgens werden de peptiden  
opgelost in 10% azijnzuur en geconcentreerd door middel  
15 van vacuümcentrifugering. De zuiverheid van de peptiden  
werd bepaald met behulp van HPLC. Een overzicht van de  
gesynthetiseerde peptiden afgeleid van ubiquicidine is in  
Figuur 1 gegeven. Van deze peptidenfragmenten werd de  
antimicrobiële activiteit bepaald zoals beschreven in  
20 voorbeeld 1 onder 2.3.

### 2.2. Antimicrobieel effect op Herpes Simplex Virus (HSV)

HSV werd gedurende 60 minuten geïncubeerd met  
oplopende concentraties van het peptidenfragment ubiqui-  
25 cidine (18-35) bij 37°C. Vervolgens werd het virusprepa-  
raat in diverse verdunningen aan Vero-cellen toegevoegd.  
Na 3 dagen bij 37°C werd het cytopathogene effect van het  
virus op Vero-cellen bepaald, waarmee tenslotte de virus-  
titer kon worden berekend. Figuur 3 toont het resultaat.

30

### 2.3. Antimicrobieel effect op Mycobacterium fortuitum

Ongeveer  $10^6$  Mycobacterium fortuitum werden  
gedurende verschillende intervallen bij 37°C geïncubeerd  
met 14  $\mu\text{M}$  of 52  $\mu\text{M}$  ubiquicidine (18-35) en vervolgens  
35 werd het aantal levende mycobacteriën in de suspensies  
bepaald met behulp van microbiologische technieken. Het  
resultaat wordt getoond in Figuur 4.

#### 2.4. Antimicrobieel effect op Staphylococcus aureus

Ongeveer  $10^6$  bacteriën van multidrug-resistente Staphylococcus aureus (MRSA) en antibioticum-gevoelige S. aureus werden gedurende 60 minuten bij 37°C aan verschillende concentraties ubiquicidine (18-35) blootgesteld, waarna het aantal levende bacteriën in de suspensies microbiologisch werd bepaald. Als negatieve controle werden hoge concentraties ubiquicidine (18-29), peptide 4 en geen peptide gebruikt. Het resultaat wordt getoond in Figuur 5.

#### 3. Resultaten

Onderzoek naar het effect van de verschillende peptiden op Klebsiella pneumoniae en Staphylococcus aureus toonde antimicrobiële activiteit van ubiquicidine (1-18), ubiquicidine (18-35) en ubiquicidine (29-41). De andere peptiden bleken aanzienlijk minder potent dan wel inactief.

In Figuur 3 worden de resultaten getoond van het experiment met HSV. Hieruit blijkt dat een toenemende concentratie peptide een afname in de virustiter tot gevolg heeft.

Figuur 4 toont dat ubiquicidine (18-35) M. fortuitum doodt gedurende een periode van 3 uur, waarna het peptide vervolgens een bacteriostatisch effect vertoont. Herhaalde toediening op 3 en 7 uur na de eerste dosis resulteert in een nagenoeg volledige eliminering van de mycobacteriën. In de controle-incubaties bleek M. fortuitum te prolifereren. In additionele controle-experimenten werd geen aanwijzing voor klontering van de mycobacteriën door ubiquicidine (18-35) gevonden (niet getoond).

Uit figuur 5 blijkt dat het peptidenfragment ubiquicidine (18-35) een duidelijk afname in het aantal CFU's van verschillende Staphylococcus aureus stammen tot gevolg heeft.

**VOORBEELD 3**Gemodificeerde peptidenfragmenten en hun activiteit

## 1. Inleiding

Een aantal van de in voorbeeld 2 beschreven  
5 peptiden(fragmenten) werd verder op verschillende manie-  
ren gemodificeerd door aan het begin en/of einde een  
extra D-alanine ter bescherming tegen exopeptidase-acti-  
viteit. Van enkele op deze wijze verkregen "afgeleiden"  
werd eveneens de antimicrobiële activiteit bepaald.

10

## 2. Materialen en methoden

## 2.1. Productie gemodificeerde peptiden

D-alanine-beschermd peptiden werden vervaar-  
digd zoals eerder beschreven (voorbeeld 2, ad 2.1) in  
15 deze aanvraag.

2.2. Antimicrobieel effect op Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus ( $5 \times 10^5$  bacteriën) werd  
gedurende verschillende perioden bij 37°C aan 7  $\mu\text{M}$  ubi-  
20 quicidine (18-35) en met D-alanine beschermd ubiquicidine  
(18-35) blootgesteld, waarna het aantal levende bacteriën  
in de suspensie microbiologisch werd gekwantificeerd.

Verder werden verschillende stammen (multidrug-  
resistente) Staphylococcus aureus gedurende 60 minuten  
25 bij 37°C met oplopende concentraties met D-alanine be-  
schermd en onbeschermd ubiquicidine (18-35) geïncubeerd,  
waarna het aantal levende bacteriën in de verschillende  
suspensies microbiologisch werd bepaald.

30 2.3. Antimicrobieel effect op Klebsiella pneumoniae

Ongeveer  $5 \times 10^6$  Klebsiella pneumoniae werden  
gedurende 60 minuten bij 37°C aan oplopende concentraties  
ubiquicidine (18-35) en met D-alanine beschermd ubiquici-  
dine (18-35) blootgesteld en vervolgens werd het aantal  
35 levende bacteriën microbiologisch gemeten.

#### 2.4. Antimicrobieel effect op Escherichia coli

Ongeveer  $10^6$  antibioticum-resistente Escherichia coli en antibioticum-gevoelige E. coli (moederstam van de resistente bacterie) werden gedurende 60 minuten bij  $37^\circ\text{C}$  aan oplopende concentraties met D-alanine beschermd ubiquicidine (18-35) blootgesteld, waarna het aantal levende bacteriën microbiologisch werd bepaald.

#### 3. Resultaten

Vergelijking van antimicrobiële activiteiten van het met D-alanine beschermde en het onbeschermd ubiquicidine (18-35) ten aanzien van Klebsiella pneumoniae in vitro toonde aan dat de met de D-alanine beschermde variant veel potenter is in het elimineren van de bacteriën dan het onbeschermd ubiquicidine (18-35)-peptide (Figuur 6).

Het maximale dodingseffect door beide varianten van ubiquicidine (ubiquicidine (18-35) en met D-alanine beschermd ubiquicidine (18-35)) op Staphylococcus aureus werd binnen 15 minuten bereikt (Figuur 7). De snelheid van eliminatie van Staphylococcus aureus bacteriën door de beide typen ubiquicidinepeptiden is identiek (Figuur 7).

De resultaten toonden verder aan dat de met D-alanine beschermde ubiquicidine effectiever (multidrug-resistente) Staphylococcus aureus doodt dan de onbeschermd variant (Figuur 8).

Zeer verrassend is de observatie dat het met D-alanine beschermde ubiquicidine (18-35) veel effectiever antibioticum-resistente Escherichia coli dan de antibioticum-gevoelige moederstam van Escherichia coli kan doden (Figuur 9).  $1\ \mu\text{M}$  met D-alanine beschermd ubiquicidine reduceert het aantal antibioticum-resistente bacteria tot beneden de detectiegrens. Een vergelijkbaar antimicrobieel effect ten opzichte van de moederstam wordt pas bereikt met  $14\ \mu\text{M}$  van het peptide. Deze gegevens tonen dat antibioticum-resistente bacteriën heel effectief

geëlimineerd kunnen worden door peptiden afgeleid van ubiquicidine.

#### VOORBEELD 4

##### 5 Met Technetium $^{99m}$ gelabelde peptidenfragmenten

###### 1. Inleiding

Er werd een hybridenmolecuul vervaardigd door de peptidenfragmenten te labelen met de straler  $^{99m}\text{Tc}$ . Dit voorbeeld illustreert de wijze van labelen volgens de  
10 uitvinding.

###### 2. Materialen en methode

Het labelen van peptide D (ubiquicidine (18-35)) en de met D-alanine beschermde ubiquicidine  
15 (18-35) met  $^{99m}\text{Tc}$  werd uitgevoerd met behulp van een werkwijze volgens de uitvinding. Hiertoe werd 10  $\mu\text{l}$  van een MAG3-gederivatiseerde peptidenoplossing (2 mg/ml in 0,01 M natriumfosfaat pH 3,0) toegevoegd aan 2  $\mu\text{l}$  van een tin(II)pyrofosfaatoplossing (0,5 mg/ml). Onmiddellijk  
20 daarna werd 4  $\mu\text{l}$  van een 10 mg/ml  $\text{KBH}_4$ -oplossing (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo, VS) in 0,1 M NaOH toegevoegd. Na het bijvoegen van 0,1 ml van een  $^{99m}\text{Tc}$ -natriumpertechnetaatoplossing (20 MBq, Mallinckrodt Medical B.V., Petten, Nederland) werd het mengsel geroerd bij  
25 kamertemperatuur gedurende 30 minuten.

De radiochemische zuiverheid van met  $^{99m}\text{Tc}$  gelabelde peptiden werd bepaald na precipitatie met 20% trichloorazijnzuur (TCA), instantane dunne-laagchromatografie (ITLC) en HPLC. Dit gebeurde in het kort door  
30 20  $\mu\text{l}$  van een vers bereid  $^{99m}\text{Tc}$ -defensine-1 of  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG te analyseren op een superose 12 kolom (Pharmacia, Upsala, Zweden), gekoppeld aan een LKB Bromma HPLC 2249 chromatografiepomp (LKB, Upsala, Zweden) en een on-line NAI (Tl)-crystal-gamma-detectiesysteem (Raytest Steffi,  
35 Duitsland). De buffer, die gebruikt werd voor het analyseren van de  $^{99m}\text{Tc}$ -gelabelde verbindingen, was 14 mM natriumfosfaat-gebufferde zoutoplossing (PBS) pH 7,5 met een stroomsnelheid van 1 ml/minuut. Labelingsopbrengsten van

$^{99}\text{Tc}$ -gelabelde peptiden werden bepaald na precipitatie met 20% TCA, HPLC-analyse en ITLC-analyse en waren respectievelijk meer dan 90%, meer dan 90% en meer dan 95%.

## 5 VOORBEELD 5

### Accumulatie van het gelabelde peptide op de plaats van infectie

#### 1. Inleiding

Om aan te tonen dat het peptiden(fragment)  
10 volgens de uitvinding infectiezoekend is werd de lokalisatie van  $^{99}\text{Tc}$ -gelabelde peptiden (ubiquicidine (18-35), ubiquicidine (1-18) en defensines alsmede, als controle, IgG) met behulp van een  $\gamma$ -camera bepaald.

#### 15 2. Materialen en methode

Muizen werden intramusculair geïnfecteerd met ongeveer  $10^6$  Staphylococcus aureus bacteriën (ATCC 25923) en vervolgens intraperitoneaal geïnjecteerd met 25  $\mu\text{g}$   $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -peptide. Tevens werden muizen intramusculair geïnjecteerd met ongeveer  $1 \times 10^8$  hitte-gedode (1 uur,  $100^\circ\text{C}$ ) S. aureus, 1  $\mu\text{g}$  endotoxine of 100 ng phorbolmyristaat acetaat (PMA) ten einde steriele ontstekingen op te wekken. Op verschillende tijdstippen na injectie van het peptide werd de radioactiviteit in de circulatie (hart), bepaalde  
25 organen (lever, nier, blaas en milt) en in beide dijspieren met behulp van een  $\gamma$ -camera gemeten. Accumulatie van het gelabelde peptide op de plaats van infectie in de rechterdijspier wordt weergegeven in Figuur 10.

#### 30 3. Resultaten

De resultaten toonden een zeer korte halfwaardetijd van de peptiden in de circulatie, namelijk  $t_{\text{half}} < 15$  minuten. Het grootste deel van de geïnjecteerde gelabelde peptiden ( $> 60\%$ ) wordt via de lever, nieren en  
35 blaas verwijderd, maar een deel van de peptiden (1-2% van de geïnjecteerde dosis) komt op de plaats van infectie in de dijspier terecht (Figuur 10).



**VOORBEELD 6**Antimicrobiële activiteit in vivo

## 1. Inleiding

Van een aantal ubiquicidinefragmenten werd de  
5 accumulatie en antimicrobiële activiteit in vivo bepaald.

## 2. Materialen en methoden

## 2.1. Infectiemodel

Voor een schematische weergave van de experi-  
10 mentele infectie en behandeling van de muizen wordt  
verwezen naar Figuur 11. Samenvattend, werden muizen  
intramusculair in de rechterdijspier geïnfecteerd met  
ongeveer  $10^6$  bacteriën en na 5 minuten intraperitoneaal  
geïnjecteerd met ongeveer 25  $\mu\text{g}$  (gelabeld) peptide. Op  
15 verschillende tijdstippen na injectie van het peptide  
werden de dieren gedood en de rechterdijspier verwijderd,  
gehomogeniseerd, en tenslotte werd het aantal bacteriën  
in het homogenaat bepaald met behulp van microbiologische  
plaattechnieken of werd accumulatie van het gelabelde  
20 peptide bepaald door middel van een  $\gamma$ -camera. Bij dit  
onderzoek werden normale en immunogecompromitteerde  
(injectie met cyclofosfamide, "total body"-bestraling)  
dieren betrokken.

25 2.2. Infectiezoekend effect van peptiden volgens de  
uitvinding

Muizen werden in de rechterdijspier geïnfecteerd met Klebsiella pneumoniae en vervolgens werd intra-  
peritoneaal 25  $\mu\text{g}$   $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -gelabeld ubiquicidine (1-18) of  
30 ubiquicidine (18-35) geïnjecteerd. Op verschillende  
tijdstippen na injectie van het peptide werd de hoeveel-  
heid activiteit in de rechter (test)- en linker (contro-  
le)- dijspier van de muis met behulp van een  $\gamma$ -camera  
gemeten. De resultaten zijn weergegeven in Figuur 12 als  
35 een ratio van de waarden in de rechterdijspier en de  
linkerdijspier, dat wil zeggen "target-to-non-target  
ratio". Ter vergelijking zijn ook de resultaten voor  
humane defensine en IgG weergegeven. Tevens werden de

target-to-non-target ratio's voor infecties en steriele ontstekingen vergeleken (Figuur 13).

2.3. Effect van antimicrobiële peptiden op experimentele infecties

Muizen werden in de rechterdijspier geïnfecteerd met Klebsiella pneumoniae (A) of Staphylococcus aureus (B). 5 minuten later werd 25 µg ubiquidine (18-35) of ubiquidine (1-18) intraperitoneaal geïnjecteerd. 24 uur na toediening van het peptide werden de dieren gedood en het aantal bacteriën in de rechterdijspier microbiologisch gekwantificeerd. Als positieve controle worden dieren intraperitoneaal geïnjecteerd met humaan defensine en als negatieve controle met het oplosmiddel van de antimicrobiële peptiden. Het resultaat staat in Figuur 14. Tevens werden de muizen geïnjecteerd met 150 mg cyclofosfamide/kg lichaamsgewicht. Vier dagen hierna werden de dieren in de rechterdijspier geïnfecteerd met K. pneumonia en een dag later werden verschillende hoeveelheden ubiquidine (18-35), ubiquidine (29-41) of defensine-1 intraveneus geïnjecteerd. Vierentwintig uur na toediening van het peptide werden de dieren gedood en het aantal bacteriën in de rechterdijspier microbiologisch gekwantificeerd. Ter controle werden normale dieren op identieke wijze behandeld. Het resultaat is in Figuur 15 weergegeven.

3. Resultaten

De accumulatie van de onderzochte peptiden bleek maximaal op 4 uur na toediening en neemt vervolgens in de loop van de tijd af (Figuur 12). Opvallend is dat de maximale accumulatie van <sup>99</sup>Tc-ubiquidine (1-18) en <sup>99</sup>Tc-ubiquidine (18-35) veel eerder bereikt wordt dan <sup>99</sup>Tc-IgG. Deze waarneming impliceert dat <sup>99</sup>Tc-ubiquidine-peptiden van belang kunnen zijn voor een snellere diagnostiek van infecties. Vergelijkbare resultaten werden gevonden indien het <sup>99</sup>Tc-peptide 24 uur na infectie intraveneus werd toegediend.

De bovengenoemde farmacologische data tonen dat ubiquicidine (1-18) en ubiquicidine (18-35) snel accumuleren in de geïnfecteerde dijspier. De resultaten van onze experimenten naar het effect van deze peptiden op  
5 het aantal bacteriën in de spier tonen dat ubiquicidine (18-35) effectiever bacteriën elimineert dan ubiquicidine (1-18) en defensines (Figuur 12). Deze in vivo resultaten komen heel goed overeen met de resultaten van de in vitro experimenten.

10           Uit Figuur 14 blijkt dat met name ubiquicidine (18-35) ook in vivo een duidelijk bacteriedodend effect heeft, dat beter is dan dat van defensine.

Het resultaat in immunogecompromitteerde dieren (Figuur 15) toont dat de bacteriedodende werking in vivo  
15 bepaald wordt door een directe bacteriedodende werking, alsmede door een immunomodulerende werking.

## CONCLUSIES

1. Gebruik van ubiquicidine of daarvan afgeleide, eventueel gemodificeerde peptidenfragmenten voor de vervaardiging van een medicament voor de behandeling, diagnostiek of profylaxe van infecties in mens en dier.

5           2. Van ubiquicidine afgeleid peptidenfragment, omvattende een bij voorkeur aaneengesloten reeks van tenminste 3, bij voorkeur tenminste 8 aminozuren uit de aminozuursequentie van ubiquicidine:  
KVHGSLARAGKVRGQTPKVAKQEKKKKKTGRAKRRMQYNRRFVNVVPTFGKKKGP-  
10 NANS.

3. Peptidenfragment volgens conclusie 2 met een van de volgende aminozuursequenties:

ubiquicidine (1-18)	KVHGSLARAGKVRGQTPK
ubiquicidine (29-41)	TGRAKRRMQYNRR
15 ubiquicidine (18-29)	KVAKQEKKKKKT
ubiquicidine (18-35)	KVAKQEKKKKKTGRAKRR
ubiquicidine (29-35)	TGRAKRR
ubiquicidine (42-59)	FVNVVPTFGKKKGP NANS
ubiquicidine (36-41)	MQYNRR

20           4. Afgeleide van ubiquicidine of van een peptidenfragment volgens conclusies 2 of 3, welke afgeleide een aminozuurvolgorde heeft, die ten minste ten dele tegengesteld is aan de aminozuurvolgorde van het overeenkomende oorspronkelijke peptiden(fragment) (zogeneten  
25 "(partieel) reverse peptide").

5. Afgeleide van een ubiquicidine of van een peptidenfragment volgens conclusies 2, 3 of 4, waarbij tenminste een van de aminozuren uit het oorspronkelijke peptiden(fragment) is vervangen door een stereoisomeer  
30 van dat aminozuur.

6. Afgeleide van ubiquicidine of van een peptidenfragment volgens conclusies 2-5, waarbij de oorspronkelijke aminozuurketen aan een of beide uiteinden daarvan is uitgebreid met een of meer tegen afbraak beschermende  
35 groepen, zoals D-aminozuren.

7. Afgeleide volgens conclusie 6 met de aminozuurvolgorde:

D-A--KVAKQEKKKKKTGRAKRR--D-A

waarin D-A staat voor D-alanine.

5                   8. Hybridenmolecuul, omvattende een kationische peptide met een antimicrobiële werking en/of een peptidenfragment volgens conclusie 2 of 3 en/of een afgeleide daarvan volgens conclusies 4-7, en een of meer effectormoleculen.

10                  9. Hybridenmolecuul volgens conclusie 8, waarbij het effectormolecuul een aminozuurketen omvat, die in staat is te binden aan een micro-organisme en/of door micro-organismen uitgescheiden of op het oppervlak daarvan tot expressie gebrachte stoffen.

15                  10. Hybridenmolecuul volgens conclusie 8, waarbij het effectormolecuul een endotoxinebindend peptide is.

                  11. Hybridenmolecuul volgens conclusie 8, waarbij het effectormolecuul een detecteerbaar label is.

20                  12. Hybridenmolecuul volgens conclusie 11, waarbij het detecteerbare label een radionuclide is, gekozen uit de groep bestaande uit technetium 99m (Tc-99m), jood 123 (I-123) en 131 (I-131), broom 75 (B-75) en 76 (B-76), lood 203 (Pb-203), gallium 67 (Ga-67)  
25 en 68 (Ga-68), arseen 72 (As-72), indium 111 (In-111), 113m (In-113m) en 114m (In-114m), ruthenium 97 (Ru-97), koper 62 (Cu-62), 64 (Cu-64) en 67 (Cu-67), ijzer 52 (Fe-52), mangaan 52m (Mn-52m), chroom 51 (Cr-51), renium 186 (Re-186) en 188 (Re-188), terbium 161 (Tb-161),  
30 Yttrium 90 (Y-90), fluor 19 (F-19), natrium 23 (Na-23), fosfor 31 (P-31), gadolinium 157 (Gd-157), mangaan 55 (Mn-55), dysprosium 162 (Dy-162), chroom 52 (Cr-52) en ijzer 56 (Fe-56).

                  13. Hybridenmolecuul volgens conclusie 8, waarbij het kationische peptide met antimicrobiële activiteit is gekozen uit  $\alpha$ - en  $\beta$ -defensines, ubiquicidine, protegrines, serprocidines, magainines, PR-39, cecropines.

14. Peptidenfragmenten volgens conclusies 2 en 3 voor gebruik in de diagnostiek, profylaxe of therapie van infecties in mens en dier.

15. Afgeleiden volgens conclusies 4-7 voor gebruik in de diagnostiek, profylaxe of therapie van infecties in mens en dier.

16. Hybridenmoleculen volgens conclusies 8-13 voor gebruik in de diagnostiek, profylaxe, therapie of monitoring van infecties in mens en dier.

10 17. Peptidenfragmenten volgens conclusie 14, afgeleiden volgens conclusie 15 of hybridenmoleculen volgens conclusie 16, waarbij de microbiële infecties zijn veroorzaakt door pathogene Gram-positieve (Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes inclusief antibiotica-resistente stammen van S.aureus (ook wel Multidrug-Resistent S.aureus (MRSA) genoemd)) en Gram-negatieve ((antibiotica-resistente) Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, enterococcen en Salmonella typhimurium) bacteriën, moeilijk te behandelen micro-organismen, zoals 20 Mycobacterium avium en Mycobacterium fortuitum, fungi (schimmels), zoals Candida albicans, Cryptococcus neoformans en Aspergillus fumigatis, virussen, in het bijzonder envelopvirussen, en parasieten, zoals Trypanosoma cruzi en Toxoplasma gondii.

25 18. Antimicrobieel middel, omvattende tenminste een geschikte hoeveelheid van een of meer actieve componenten, gekozen uit ubiquicidine, peptidenfragmenten volgens conclusies 2 en 3, afgeleiden volgens conclusies 4-7, hybridenmoleculen volgens conclusies 8-13, eventueel 30 in de aanwezigheid van een of meer geschikte excipienten.

19. Antimicrobieel middel volgens conclusie 18 voor gebruik in therapie en profylaxe in mens en dier.

20. Diagnostisch middel, omvattende een geschikte hoeveelheid van een of meer van een detecteerbaar 35 label voorziene actieve componenten, gekozen uit ubiquicidine, peptidenfragmenten volgens conclusies 2 en 3, afgeleiden volgens conclusies 4-7, hybridenmoleculen volgens conclusies 8-13.

21. Diagnostisch middel volgens conclusie 19 voor gebruik in diagnostiek en monitoring.

22. Werkwijze voor het labelen van een kationisch peptide met antimicrobiële werking, omvattende het  
5 in contact brengen van het te labelen peptide met een tin(II)-zout, een boorhydride en een radioactief label in de aanwezigheid van loog, waarbij het peptide gemodificeerd is met MAG3 (mercaptoacetyl glycine-glycine-glycine).

10 23. Werkwijze volgens conclusie 22 waarbij het tin(II)-zout en het boorhydride respectievelijk tin(I-I)pyrofosfaat en natriumboorhydride of kaliumboorhydride zijn, welke gebruikt worden in een verhouding tussen 1:1 en 1:10, bij voorkeur 1:4 in hoeveelheden van respectie-  
15 velijk 0.5-5  $\mu$ l en 2-10  $\mu$ l, waarbij het radioactieve label een standaardoplossing van  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetaat of  $^{186}\text{Re}$ -perrenaat is in een hoeveelheid van 0,05-0,5 ml, bij voorkeur 0,1 ml, waarbij het loog natronloog is en de loogconcentratie 0,5-5 M, bij voorkeur 0,1 M, en waarbij  
20 het geheel gedurende 1 tot 60 minuten, bij voorkeur 5 to 30 minuten geroerd wordt bij een temperatuur tussen kamertemperatuur en 40°C, en bij voorkeur bij ongeveer 37°C.

24. Werkwijze voor het vervaardigen van ubiqui-  
25 cidine, peptidenfragmenten volgens conclusies 2 en 3, afgeleiden volgens conclusies 4-7, hybridenmoleculen volgens conclusies 8-13 door het transformeren van een dierlijke eicel met een genconstruct dat codeert voor het ubiquicidine, peptidenfragment, afgeleide of hybridenmo-  
30 lecuul, het uit de getransformeerde eicel regenereren van een transgeen dier en het uit een weefsel of lichaamsvloeistof van het dier, bijvoorbeeld melk, isoleren van het ubiquicidine, peptidenfragment, afgeleide of hybridenmolecuul.

## UITTREKSEL

De uitvinding betreft het gebruik van ubiquicidine of daarvan afgeleide, eventueel gemodificeerde peptidenfragmenten voor de vervaardiging van een medicament voor de behandeling, diagnostiek of profylaxe van infecties in mens en dier. Een van ubiquicidine afgeleid peptidenfragment omvat bijvoorbeeld een bij voorkeur aaneengesloten reeks van tenminste 3, bij voorkeur tenminste 7-13 aminozuren uit de aminozuursequentie van ubiquicidine:

10 KVGHSLARAGKVRGQTPKVAKQEKKKKKTGRAKRRMQYNRRFVNVVPTFGKKKGP-NANS.

Hybridenmoleculen omvatten bijvoorbeeld een kationische peptide met een antimicrobiële werking en/of een peptidenfragment van ubiquicidine en/of een afgeleide daarvan en een of meer effectormoleculen.

15



**PEPTIDE**

Ubiquitidine: (59aa, 6.654 kD)	KVHGSLARAGKVRGQTPKVAKQEKKKKKTGRAKRRMQYNRRFVNVVPTFGKKKGPNANS
(1-18, 2.153 kD)	KVHGSLARAGKVRGQTPK
(29-41, 1.910 kD)	TGRAKRRMQYNRR
(18-29, 1.643 kD)	KVAKQEKKKKKT
(18-35, 3.477 kD)	KVAKQEKKKKKTGRAKRR
(18-35, 3.656 kD)	AKVAKQEKKKKKTGRAKRR
(29-35, 953 D)	TGRAKRR
(42-59, 2.213 kD)	FVNVVPTFGKKKGPNANS
(36-41, 957 D)	MQYNRR

FIG.1

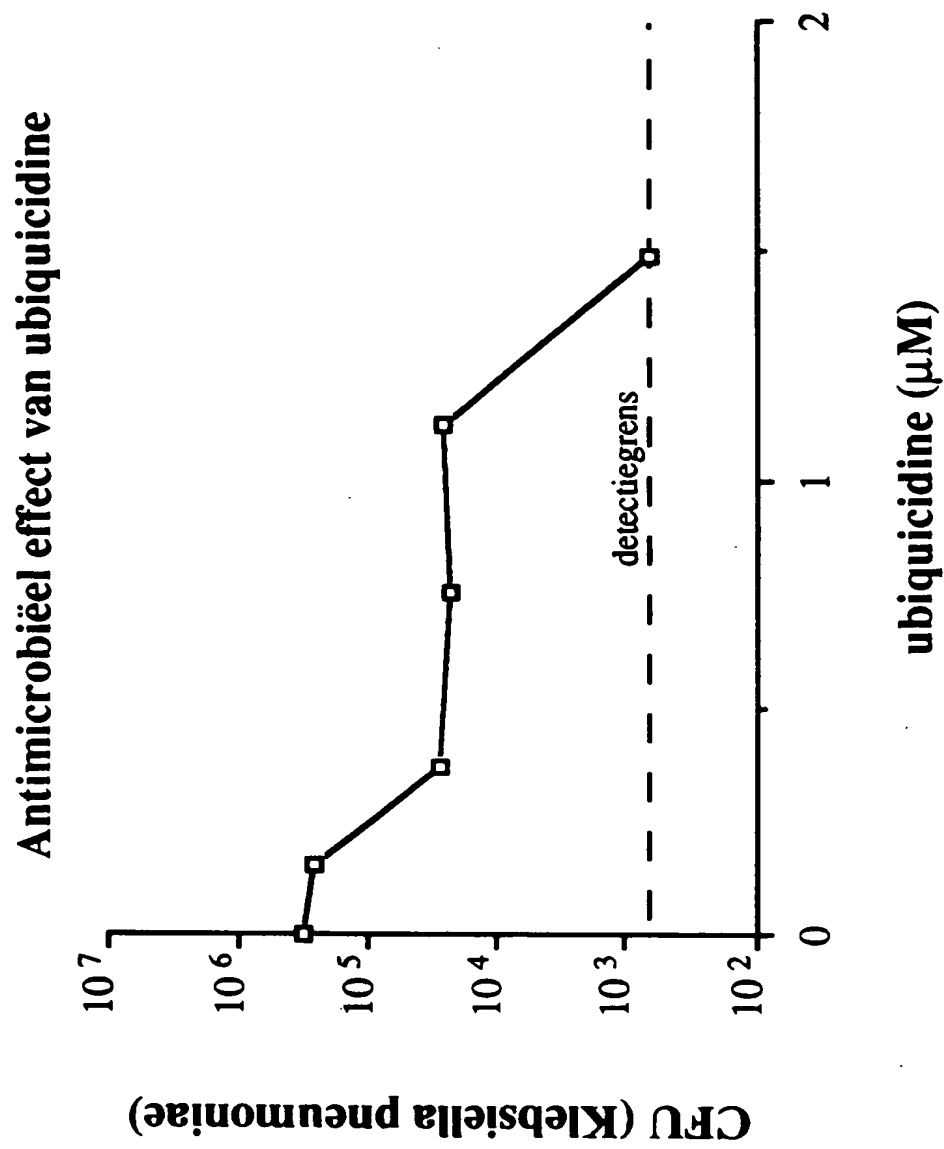


FIG. 2A

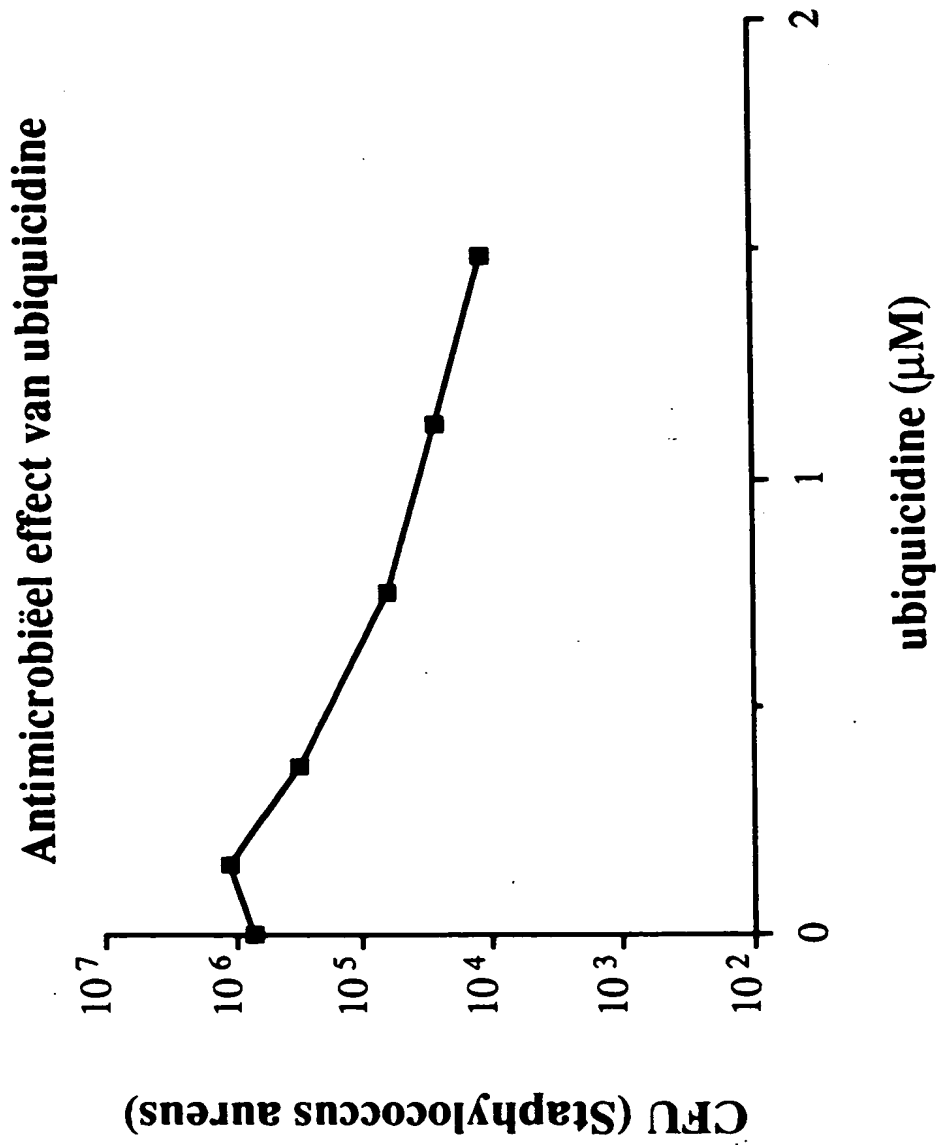


FIG. 2B

Effect van ubi (18-35) op herpes simplex virus

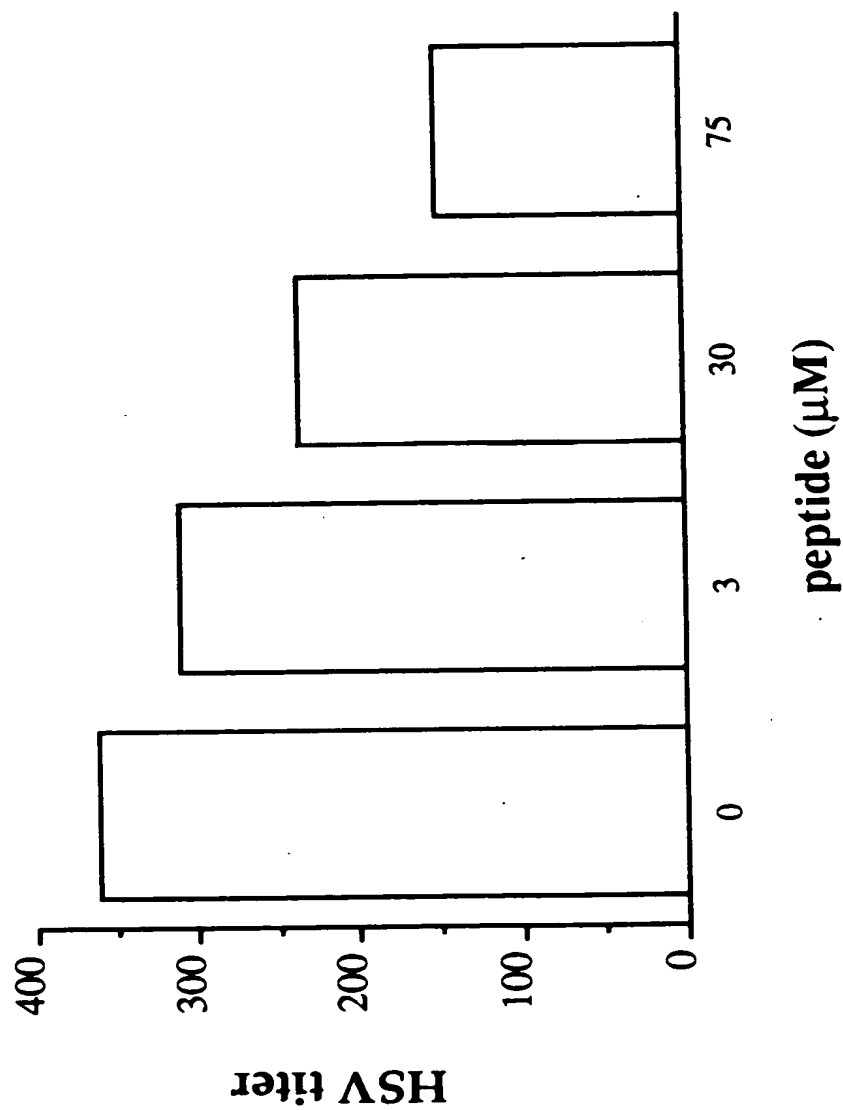


FIG. 3

Effect van ubi (18-35) op Mycobacterium fortuitum

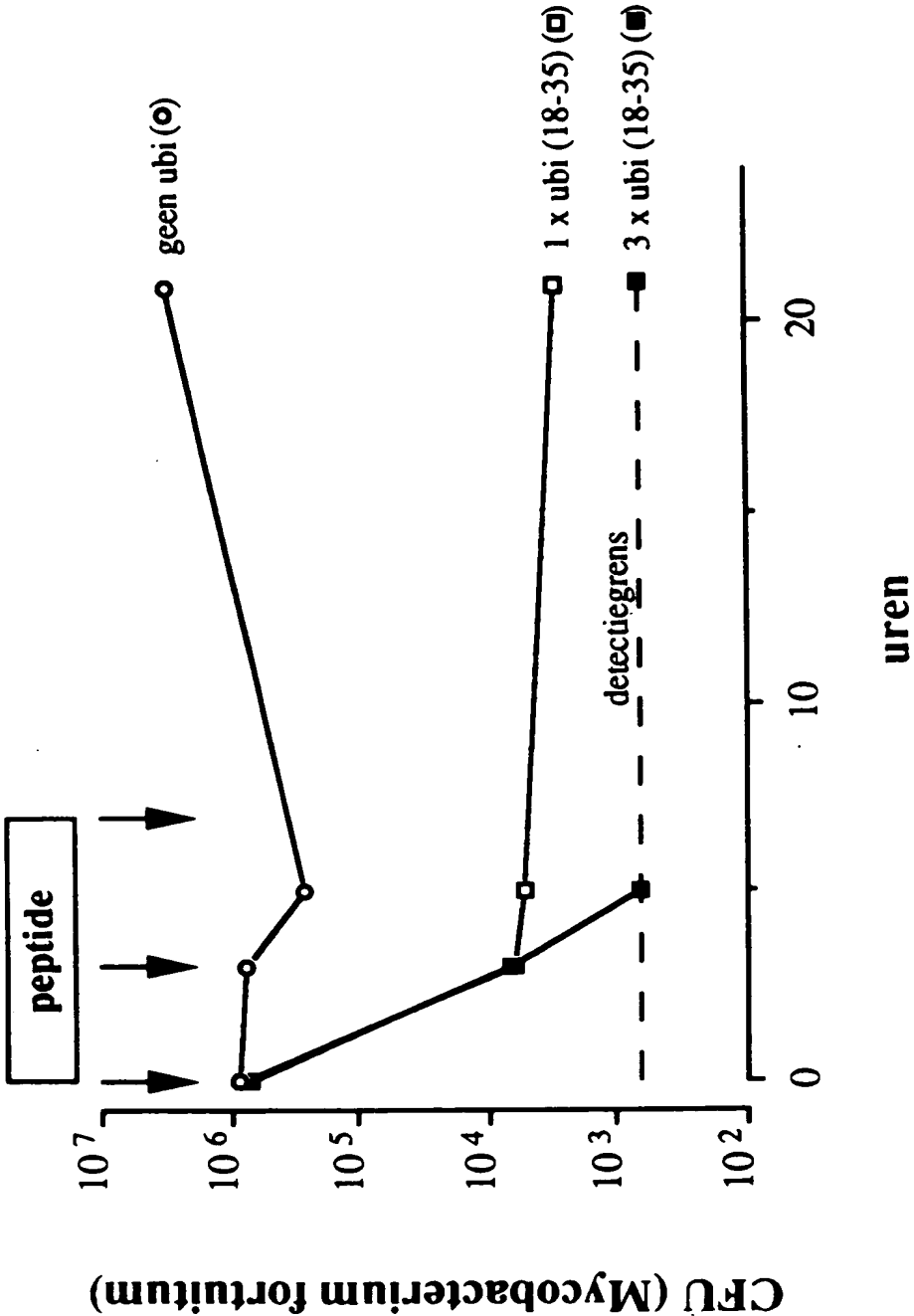
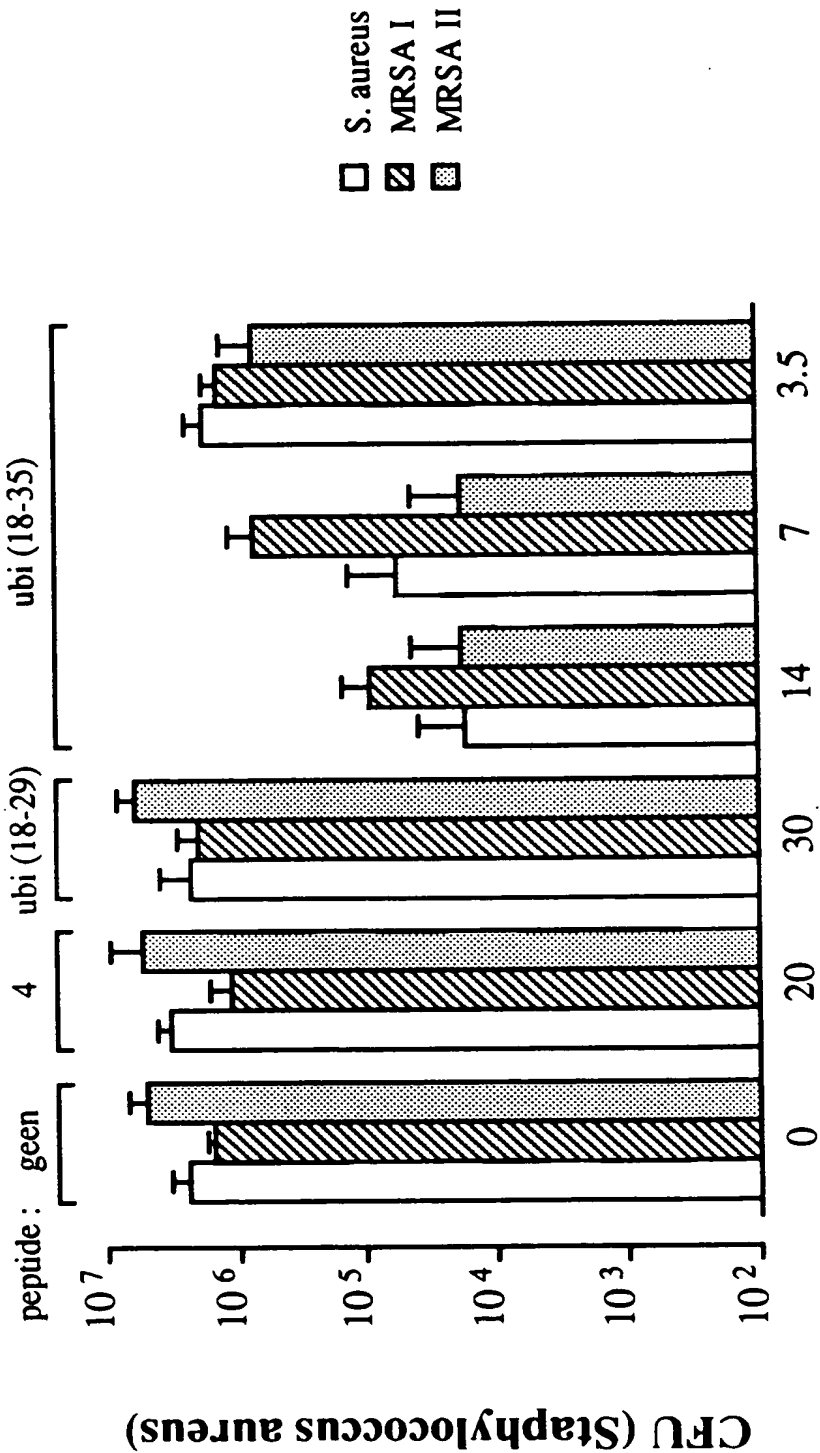


FIG. 4

Effect van ubi (18-35) en controle peptiden op *S. aureus* en antibioticum-resistente *S. aureus* (MRSA)



peptide (μM)

FIG. 5

Effect van ubi (18-35) en D-ala-beschermd ubi (18-35)  
op *Klebsiella pneumoniae*

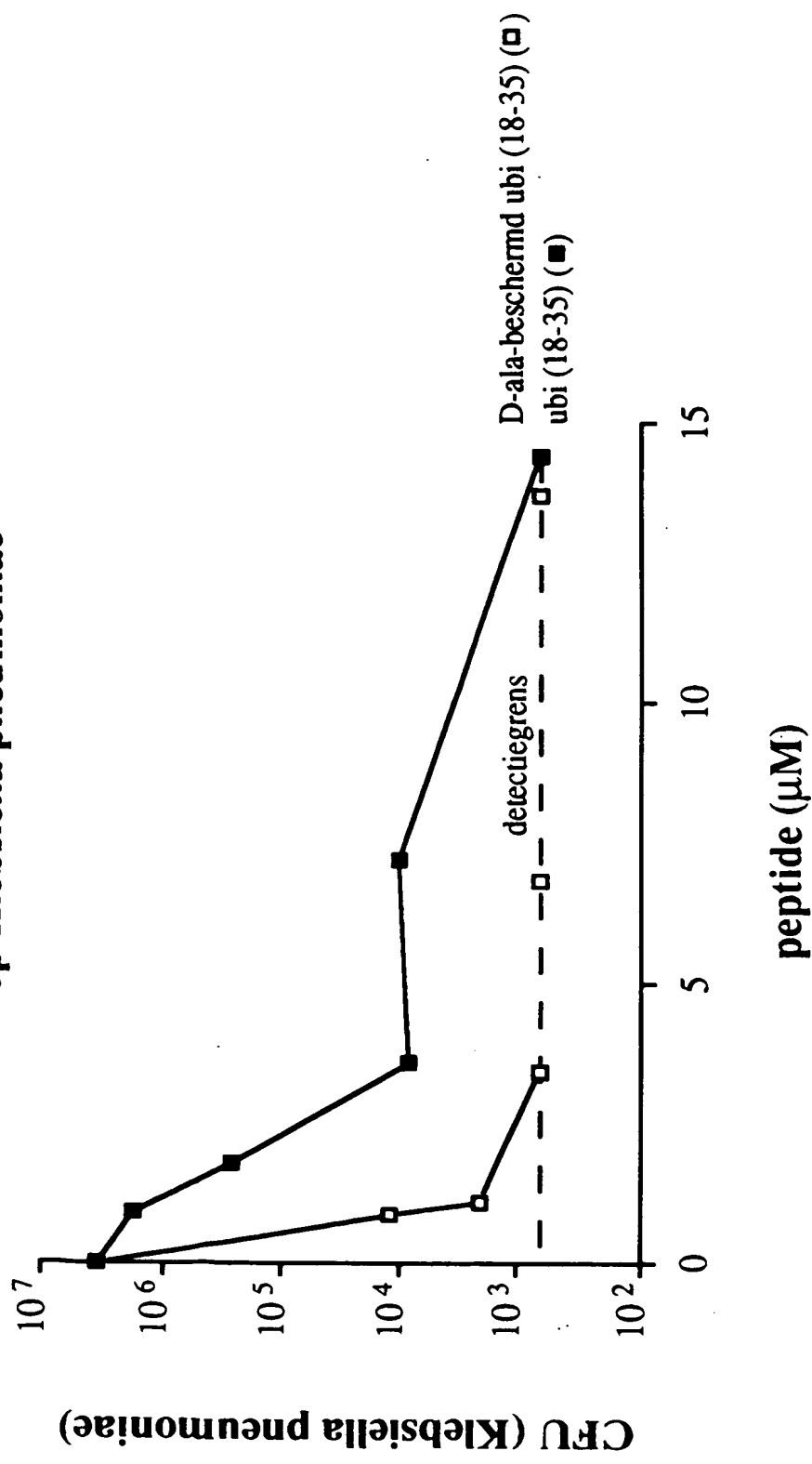


FIG. 6

Eliminatie snelheid van *S. aureus* door ubi (18-35)  
en D-ala-beschermd ubi (18-35)

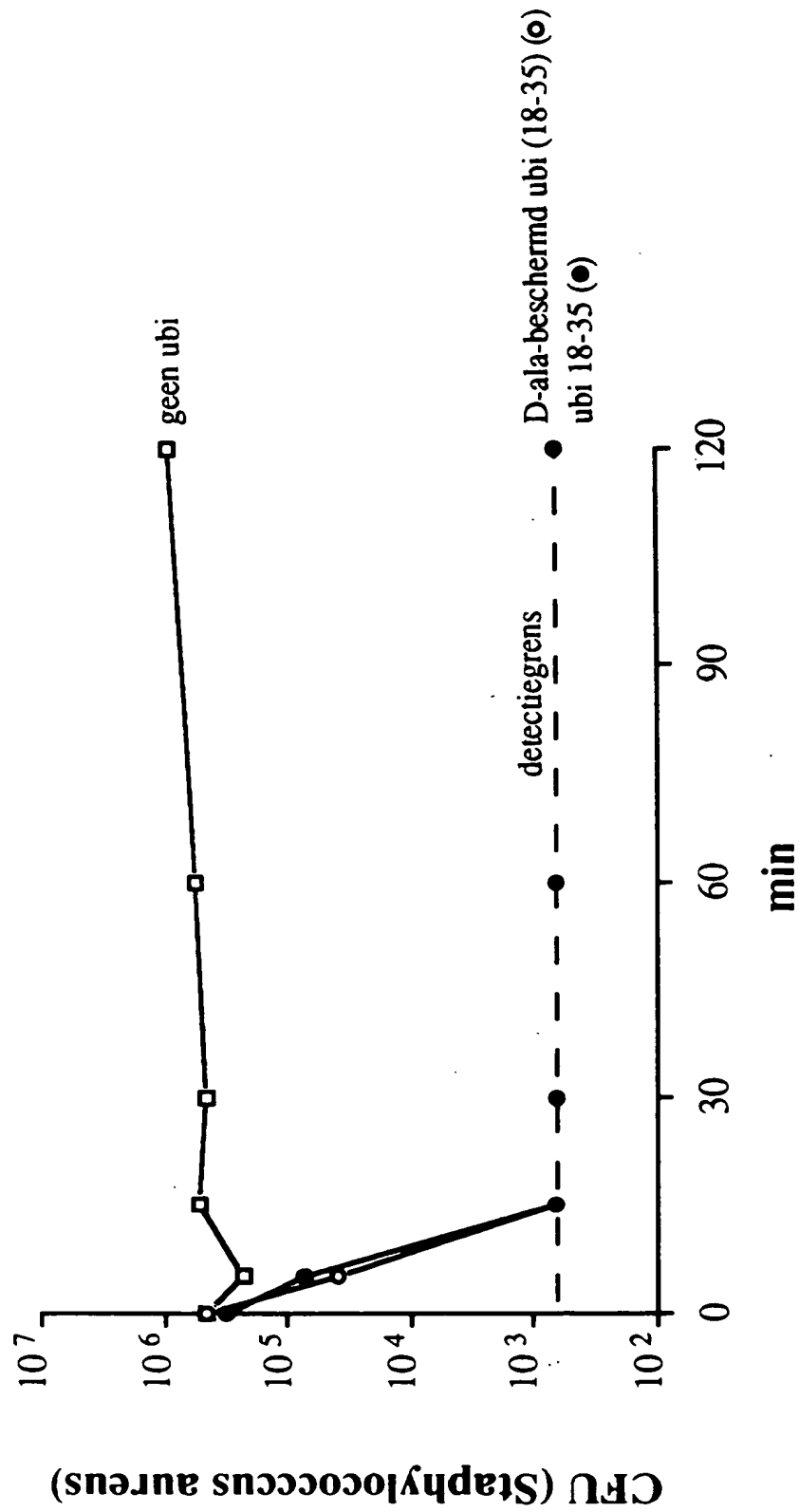
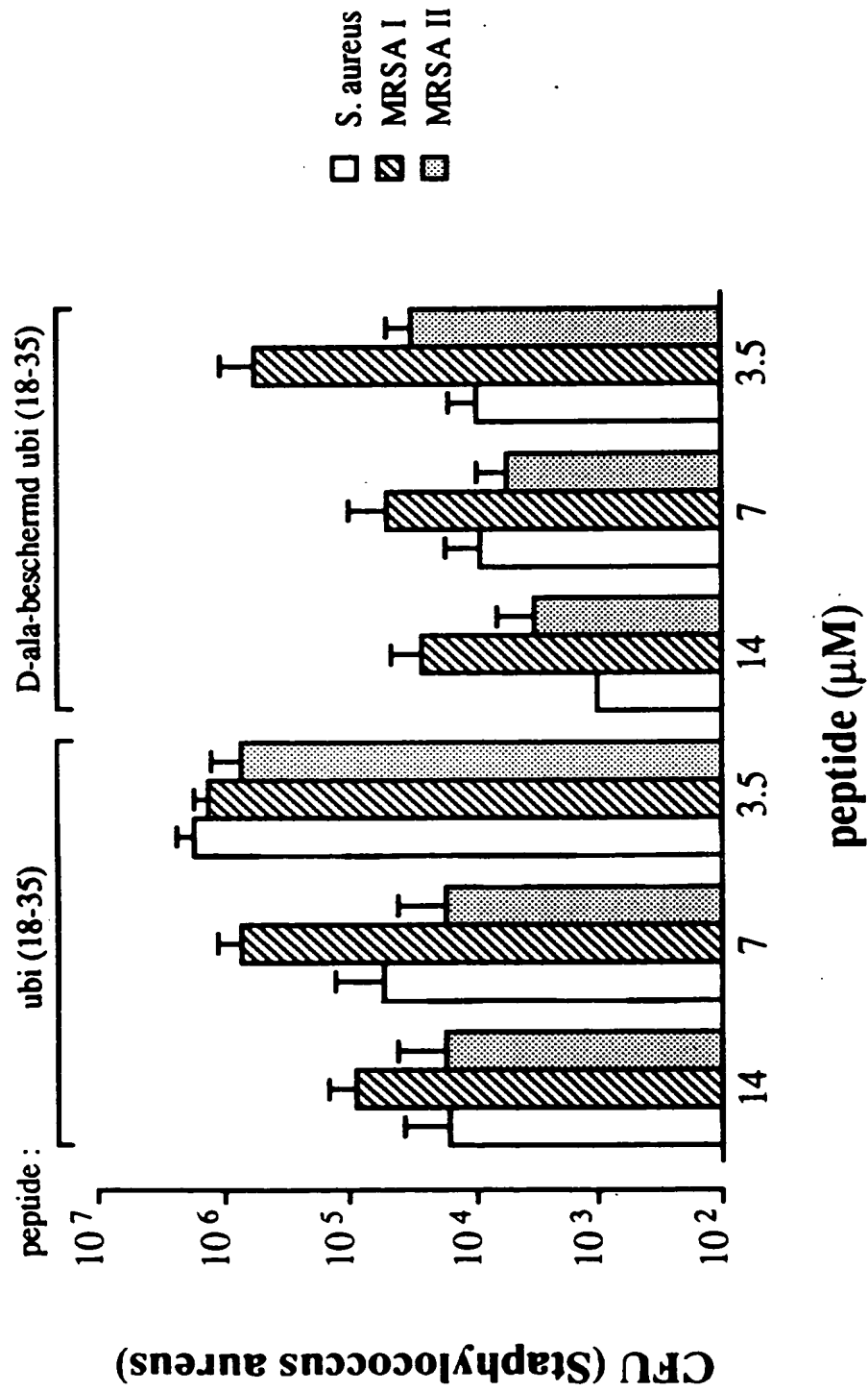


FIG. 7

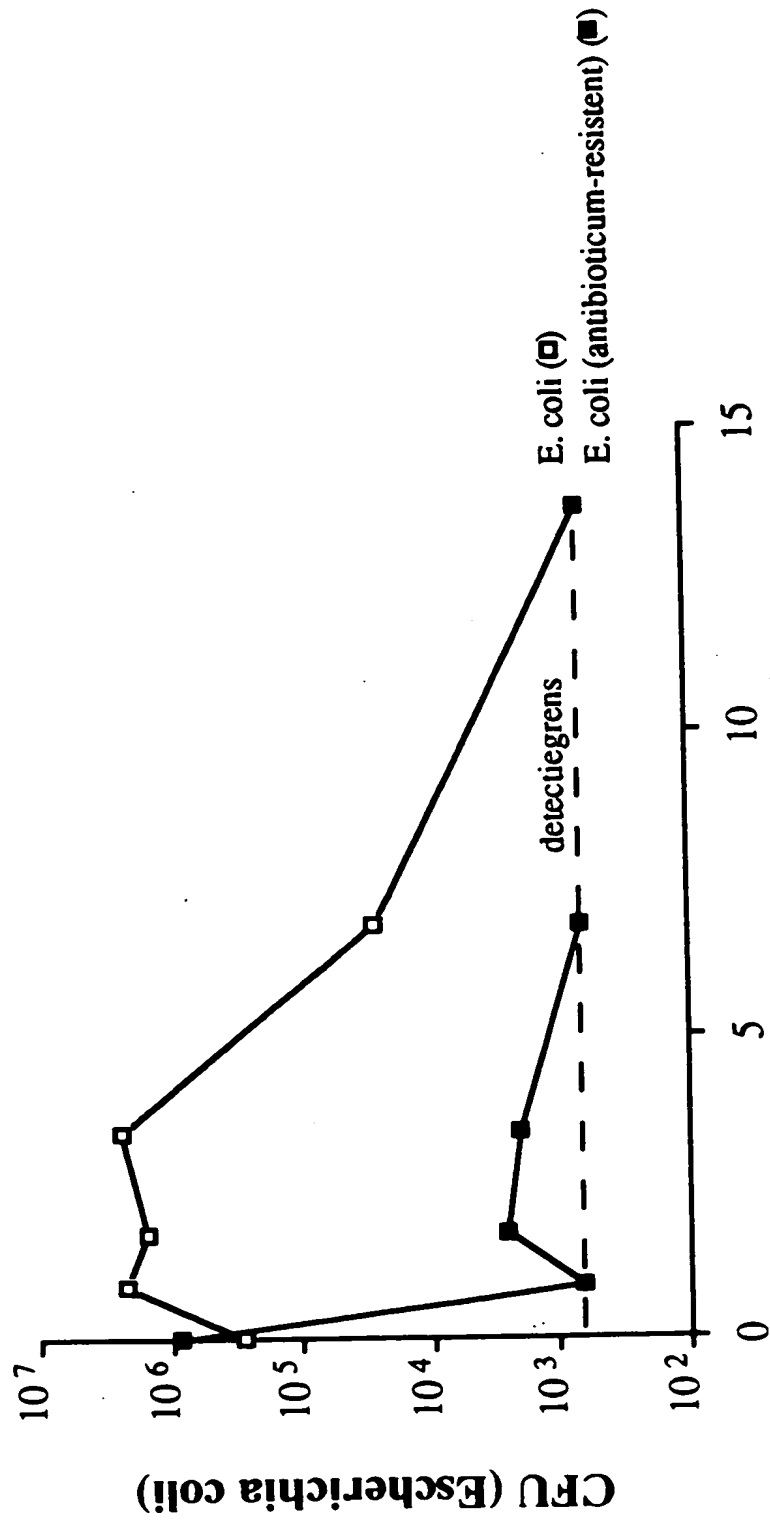


**Effect van ubi (18-35) en D-ala-beschermd ubi (18-35) op *S. aureus* en antibioticum-resistente *S. aureus* (MRSA)**



**FIG. 8**

Effect van D-ala-beschermd ubi (18-35) op *E. coli*  
en antibioticum resistente *E. coli*



peptide ( $\mu\text{M}$ )

FIG. 9

# Infectie model

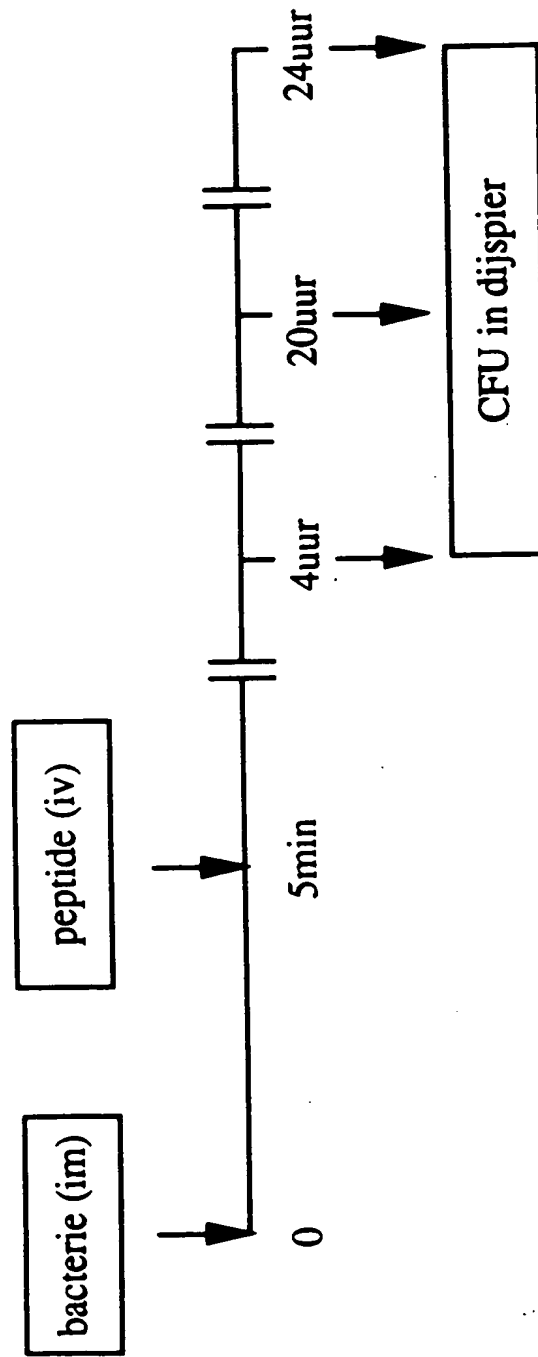


FIG. 10

Accumulatie van  $^{99m}\text{Tc}$ Technetium-gelabelde ubiquidine (18-35) in de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 geïnfecteerde dijspier na i.p. toediening

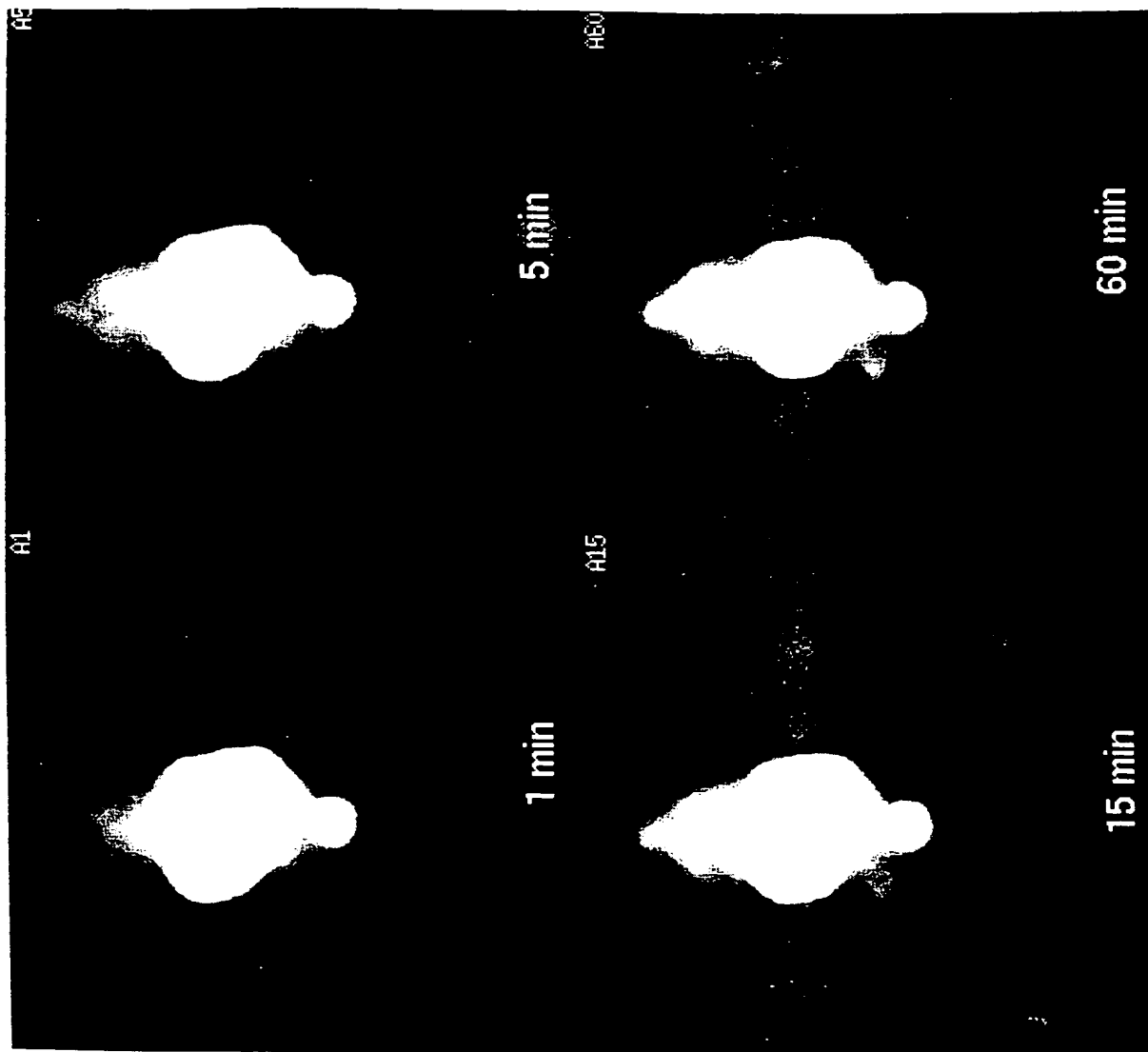


FIG. 11

# Accumulatie van $^{99m}\text{Tc}$ -peptiden in de Klebsiella pneumoniae ATCC 43816 geïnfecteerde dijspier

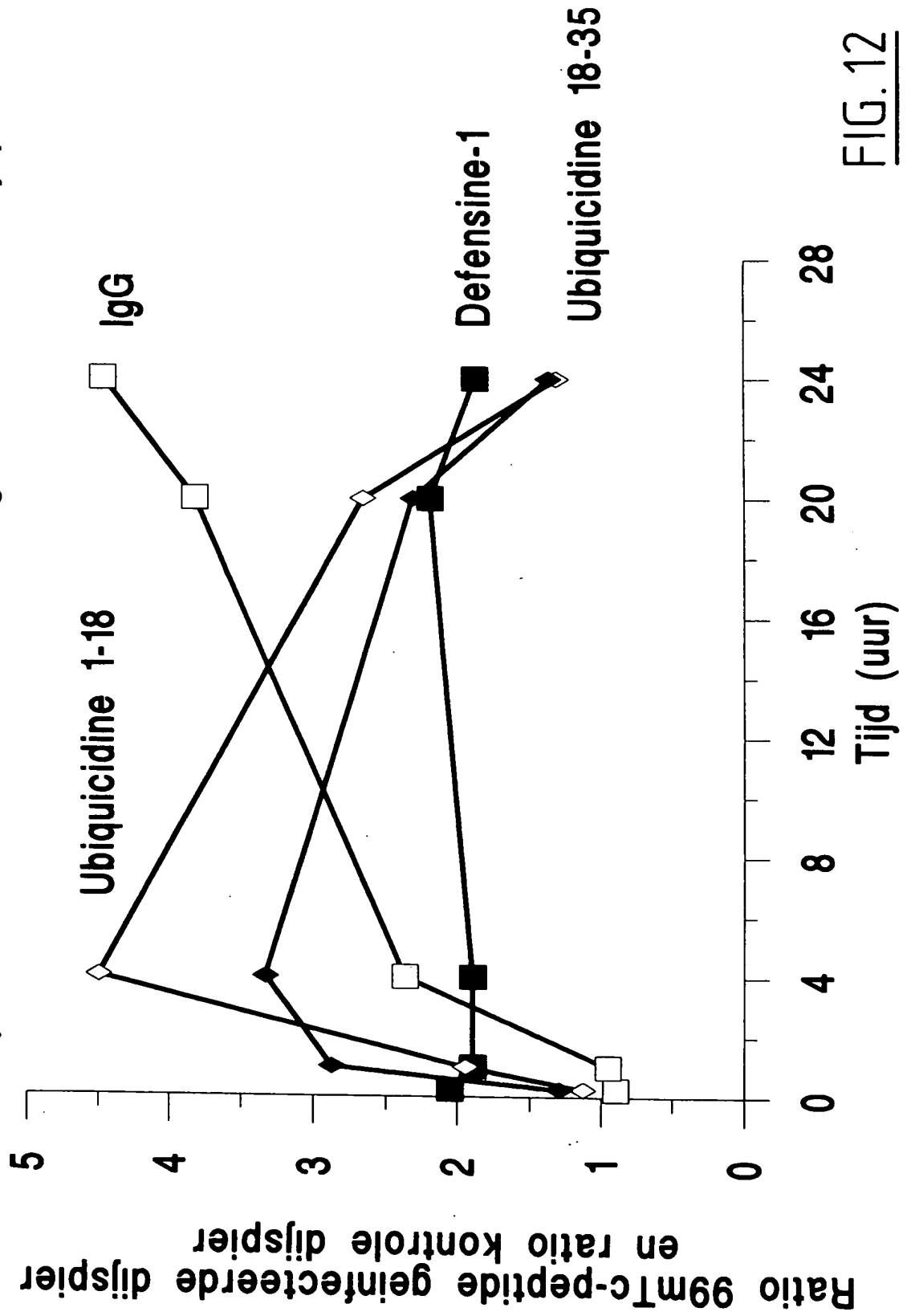
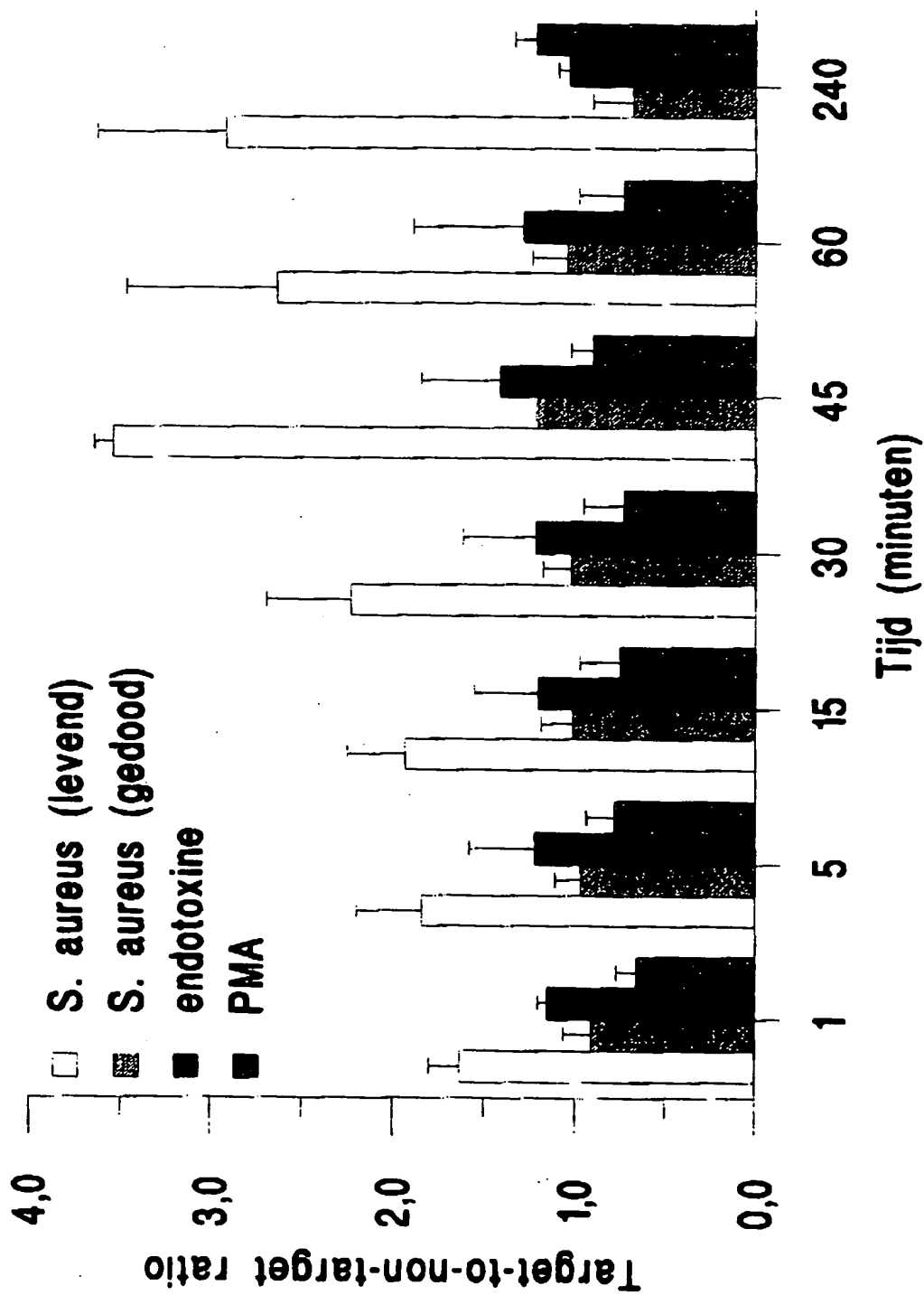


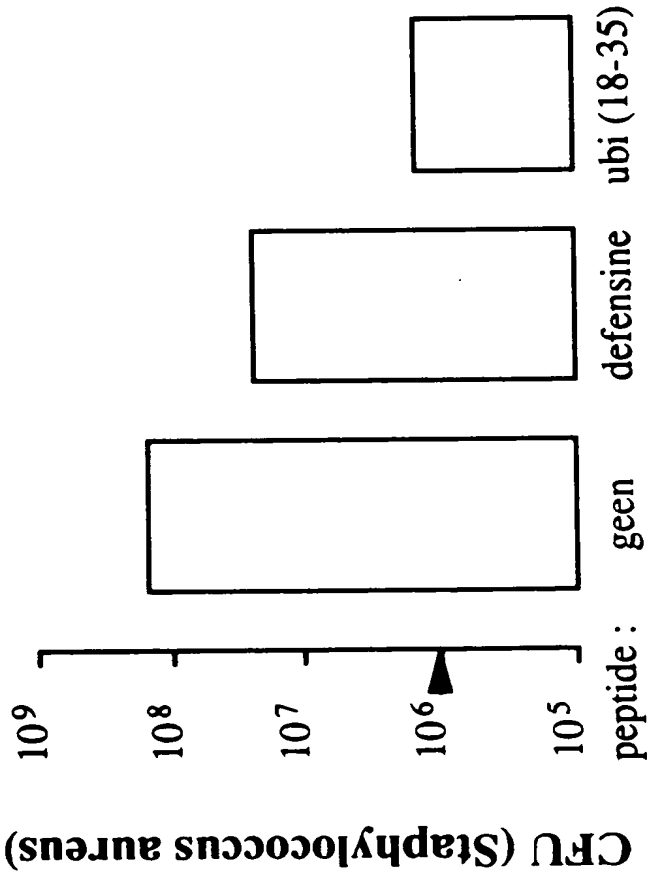
FIG. 12

Figuur 13

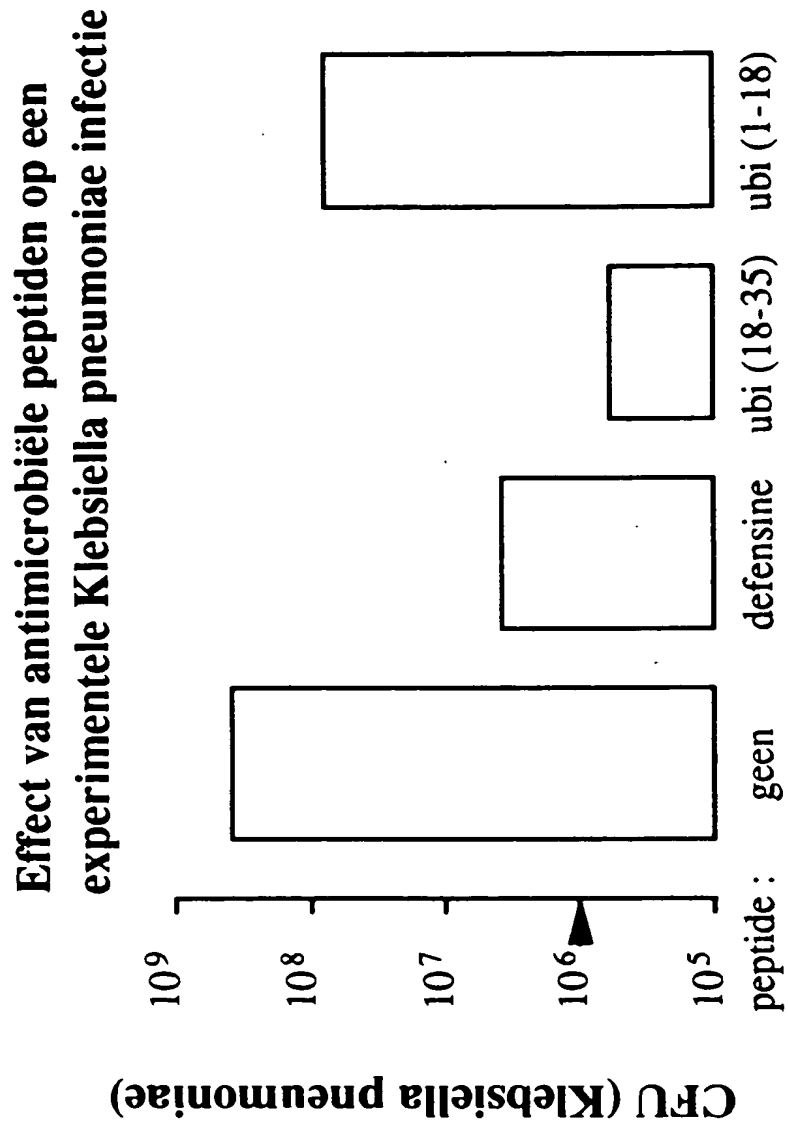
Accumulatie van  $^{99m}\text{Tc}$ -gelabeld ubiquidine 18-35 in een infectiehaard maar niet in ontstekingen



Effect van antimicrobiële peptiden op een  
experimentele Staphylococcus aureus infectie



Figuur 14A

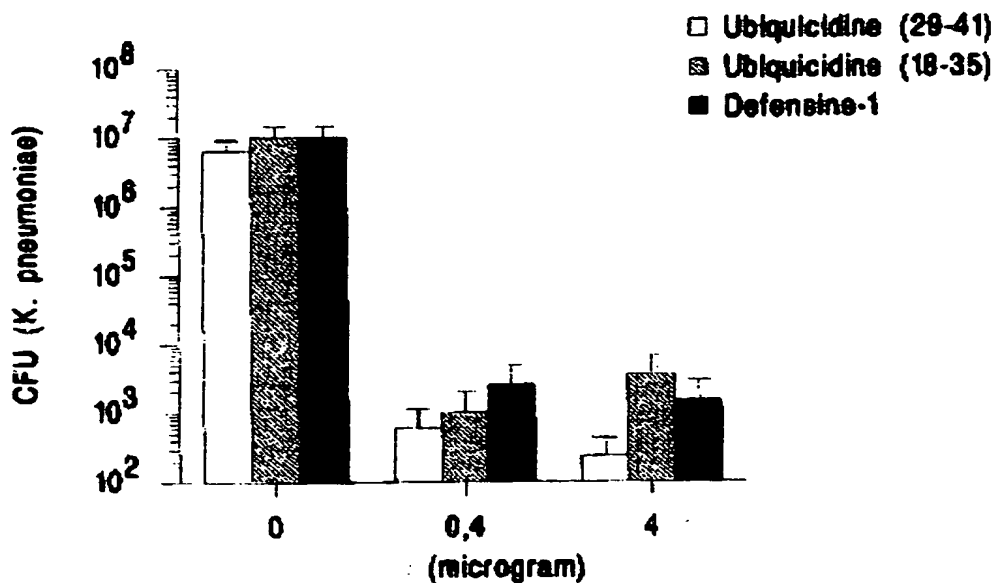


Figuur 14B

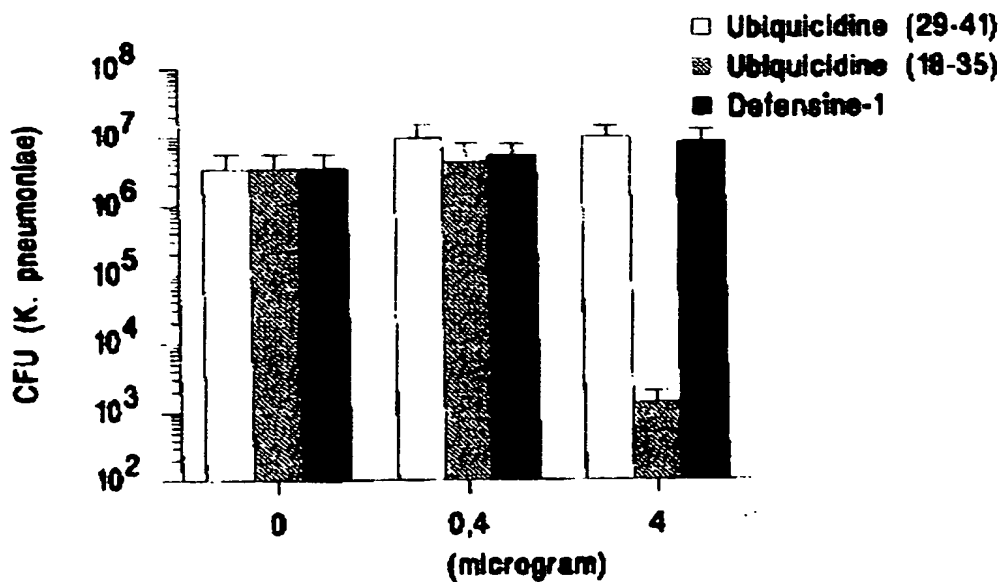


Figuur 15

Antimicrobieel effect van ubiquicidine 29-41 en 18-35 en defensine-1 in muizen



Antimicrobieel effect van ubiquicidine 29-41 en 18-35 en defensine-1 in cyclofosfamide behandelde muizen





## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/11, C07K 14/00, 14/47, G01N 33/68, A61K 51/08, 38/04</b>	<b>A1</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 98/54314</b> <b>(43) International Publication Date:</b> 3 December 1998 (03.12.98)
<p><b>(21) International Application Number:</b> PCT/NL98/00311</p> <p><b>(22) International Filing Date:</b> 29 May 1998 (29.05.98)</p> <p><b>(30) Priority Data:</b>          1006164 29 May 1997 (29.05.97) NL</p> <p><b>(71) Applicant (for all designated States except US):</b> RIJKSUNIVERSITEIT LEIDEN [NL/NL]; Stationsweg 46, NL-2312 AV Leiden (NL).</p> <p><b>(72) Inventors; and</b>  <b>(75) Inventors/Applicants (for US only):</b> NIBBERING, Petrus, Hendricus [NL/NL]; Chopinlaan 5, NL-2215 SL Voorhout (NL). HIEMSTRA, Pieter, Sicco [NL/NL]; Schelling 2, NL-2353 TE Leiderdorp (NL). VAN DEN BARSELAAR, Maria, Theodora [NL/NL]; Rozeveldlaan 15, NL-2241 NR Wassenaar (NL). PAUWELS, Ernest, Karel, Jacob [NL/NL]; Van Beuningenlaan 10, NL-2334 CC Leiden (NL). FEITSMA, Rolf, Ide, Johannes [NL/NL]; Kapteynstraat 43, NL-2313 RM Leiden (NL).</p> <p><b>(74) Agent:</b> VAN SOMEREN, Petronella, Francisca, Hendrika, Maria; Arnold &amp; Siedsma, Sweelinckplein 1, NL-2517 GK The Hague (NL).</p>		<p><b>(81) Designated States:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Published</b>  <i>With international search report.</i>  <i>Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>  <i>In English translation (filed in Dutch).</i></p>
<b>(54) Title:</b> ANTIMICROBIAL PEPTIDES DERIVED FROM UBIQUICIDINE		
<p><b>(57) Abstract</b></p> <p>The invention relates to the use of ubiquicidine or optionally modified peptide fragments derived therefrom for the preparation of a drug for the treatment, diagnostics or prophylaxis of infections in humans and animals. A peptide fragment derived from ubiquicidine comprises for instance a preferably continuous series of at least 3, preferably at least 7-13 amino acids from the amino acid sequence of ubiquicidine: KVGSLARAGKVRGQTPKVAQEKKKKKKTGRAKRRMQYNRRFVNVVPTFGKKKKGPNANS. Hybrid molecules comprise for instance a cationic peptide with an antimicrobial action and/or a peptide fragment of ubiquicidine and/or a derivative thereof and one or more effector molecules.</p>		

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece			TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	ML	Mali	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MN	Mongolia	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MW	Malawi	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	MX	Mexico	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Netherlands	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NO	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	NZ	New Zealand		
CM	Cameroon			PL	Poland		
CN	China	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Romania		
CZ	Czech Republic	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
DE	Germany	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Denmark	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapore		

## ANTIMICROBIAL PEPTIDES DERIVED FROM UBIQUICIDINE

The present invention relates to the new medical use of a per se known peptide, which will be referred to as "ubiquicidine" in this application. The invention further relates to new peptide fragments derived from this peptide, optionally in modified form or provided with a (radioactive) label, and the use hereof in prophylaxis, therapy and diagnostics of infections in humans and animals. The invention also relates to new antimicrobial and diagnostic agents on the basis of the peptide, the peptide fragments and/or modified versions thereof, optionally in the form of combination preparations. Finally, the invention also provides a new method for preparing radioactively labelled peptides with antimicrobial activity.

In an increasing number of cases the use of what are called "classic" antibiotics is not sufficient for the treatment of infectious diseases. Many bacteria strains have built up resistance against the known classes of antibiotic and in the last thirty years no new classes of antibiotic have been discovered. There are few or no adequate agents against mycobacteria. And other microorganisms, such as fungi, and determined parasites are also sometimes difficult to treat with existing antimicrobial agents. In view of the above, a new class of antimicrobial agents is highly desirable.

At present, two new types of antimicrobial agents are attracting attention. On the one hand there are the carbohydrate-type agents. In addition, research is focusing on peptides, particularly (cationic) peptides, with antimicrobial activity. Cationic peptides contain a relatively large number of positively charged amino acids, such as arginine and lysine, and therefore carry a net positive charge, usually of at least +2, but often +4 or more. Antimicrobial peptides are an important component of the natural defence of most living organisms against infections. Many such antimicrobial peptides are

cationic. In humans and other mammals such peptides, such as the defensins, are an important protein-like constituent of for instance neutrophil granulocytes. These cells are already involved at a very early stage in the defence against micro-organisms and in acute inflammation reactions. In addition, such peptides are also produced by many other cells, including epithelial cells, which are strategically located in relation to invading micro-organisms.

10 In the research which resulted in the present invention, it was found that the per se known peptide FAU S30 (which has now been called "ubiquicidine" by the present inventors) has antimicrobial action. It was further found that peptide (fragments) derived from this peptide also have an antimicrobial action to a lesser or greater extent. These peptide (fragments) as such have not been described previously and are therefore still new.

15 On the basis of this conclusion, the present invention provides the use of ubiquicidine or optionally modified peptide (fragments) derived therefrom for preparing a drug for the treatment, diagnostics or prophylaxis of infections in humans and animals.

20 The advantage of ubiquicidine and fragments thereof is that they not only have an antimicrobial and immunomodulating action, but that they also make their way in the body in targeted manner to the actual site of infection and accumulate there. These peptide (fragments) are therefore infection-seeking.

25 In this application "antimicrobial action" is understood to mean any inhibiting or otherwise negative effect on bacteria, viruses, protozoa, parasites and fungi.

"Immunomodulating action" is understood in this application to mean any stimulating effect on body cells of humans and/or animals involved in the defence against infections.

35 "Ubiquicidine" is understood in this application to mean a peptide of 6.654 kD with an amino acid sequence as shown in figure 1.

40 Peptide fragments derived from ubiquicidine comprise a preferably continuous series of at least 3, preferably

at least 8 amino acids from the amino acid sequence of ubiquicidine as shown in figure 1. For an average skilled person it is simple to ascertain whether a peptide fragment with a series of preferably continuous amino acids  
5 chosen from the amino acid sequence of ubiquicidine does actually have antimicrobial activity and thus meets the requirements of the invention. A simple standard test for determining antimicrobial activity is for instance the  
10 universally known growth-killing test, i.e. determining of the concentration of an antimicrobial agent which kills 99% of the micro-organisms (IC 99%). Designated by "peptide (fragments)" in this application are therefore all amino acid chains which are smaller than the ubiquicidine itself, but the amino acid sequence of which is to  
15 be found, preferably continuously, in the ubiquicidine. The length of such peptide (fragments) can vary from 3 to 58 amino acids, wherein possible extra amino acids added as modification are not included.

Examples of peptide (fragments) are the peptides of  
20 which the sequence is shown in figure 1. Ubiquicidine (18-35)-D-alanine has as extra addition a D-alanine at both ends. Of the peptide fragments shown in figure 1, ubiquicidine (1-18), ubiquicidine (18-35) and ubiquicidine (29-41) are particularly recommended. In the above  
25 described test the activity of these fragments lies around 1  $\mu\text{M}$ . This is a particularly good antimicrobial activity. In principle however, all the above defined peptides, which display some inhibiting action or other on micro-organisms, fall within the invention. Peptides  
30 with an IC 99% of a maximum of 25  $\mu\text{M}$ , preferably a maximum of 10  $\mu\text{M}$ , most preferably a maximum of 1  $\mu\text{M}$  are however recommended.

In order to modify their activity, for instance to further increase it, or to inhibit or prevent degradation  
35 by enzymes, particularly peptidases, both the peptide (ubiquicidine) and the fragments can be modified in different ways. Modification is any variation from the naturally occurring amino acid chain. Modifications may be mutual linking in reverse sequence of at least a part  
40 of the amino acids of the peptide or a peptide fragment.

When all amino acids of a peptide (fragment) are thus reversed, this is referred to as "reverse peptide (fragment)".

One or more of the amino acids from the original peptide (fragment) can also be replaced by a stereoisomer of that amino acid. The L-isomers of amino acids occur in the body. The D-stereoisomers can be degraded much less easily by enzymes present in the body and bacterial enzymes. Such a modification ensures that the peptide (fragment) in the body remains intact longer and can exert its effect longer. A similar modification consists of extending the original amino acid chain at one or both ends with one or more groups protecting against degradation, such as D-amino acids, for instance D-alanine.

All the amino acid chains modified in the above described manner or varying in other manner from the corresponding native peptide (fragment) will be designated in this application with the term "derivative". These can be derivatives of the ubiquicidine as well as of fragments thereof.

The invention further relates to so-called "hybrid molecules", which comprise a (cationic) peptide with an antimicrobial action and/or a peptide fragment and/or a derivative thereof according to the invention together with one or more effector molecules. The effector molecule can assume different forms, such as an amino acid chain, which is capable of binding to a micro-organism and/or substances secreted by micro-organisms or expressed on the surface thereof. An example of such an effector molecule is an endotoxin-binding peptide.

Another type of effector molecule can consist of a virus protein. Such a virus protein/antimicrobial peptide can enter the host cell, in which the micro-organism for combatting is situated, in the known manner of a virus and the peptide can exert its antimicrobial action therein.

The effector molecule can further be a detectable label, such as a radionuclide, chosen from the group consisting of technetium 99m (Tc-99m), iodine 123 (I-123) and 131 (I-131), bromine 75 (B-75) and 76 (B-76), lead 203

(Pb-203), gallium 67 (Ga-67) and 68 (Ga-68), arsenic 72 (As-72), indium 111 (In-111), 113m (In-113m) and 114m (In-114m), ruthenium 97 (Ru-97), copper 62 (Cu-62), 64 (Cu-64) and 67 (Cu-67), iron 52 (Fe-52), manganese 52m (Mn-52m), chromium 51 (Cr-51), rhenium 186 (Re-186) and 188 (Re-188), terbium 161 (Tb-161) and yttrium 90 (Y-90). The radionuclide (also called "emitter") can also fulfil a curative function. Paramagnetic labels, such as fluorine 19 (F-19), sodium 23 (Na-23), phosphorus 31 (P-31), gadolinium 157 (Gd-157), manganese 55 (Mn-55), dysprosium 162 (Dy-162), chromium 52 (Cr-52) and iron 56 (Fe-56) can also be used.

According to the invention combinations of effector molecules can likewise be linked to the peptide. An example thereof are a cell-binding peptide and an emitter, wherein the cell-binding peptide and the antimicrobial peptide provide targeting of the hybrid molecule to the site of infection and the antimicrobial peptide and the emitter provide for treatment or diagnosis.

Hybrid molecules of this type which consist of an antimicrobial peptide, peptide fragment or derivative thereof and at least one effector molecule have not been described previously. The "hybrid molecules" according to the invention are not therefore limited to the ubiquicidine as antimicrobial peptide, but generally comprise hybrid molecules comprising a (cationic) peptide with antimicrobial activity and/or fragments and/or derivatives thereof. Examples of other such antimicrobial peptides are  $\alpha$ - and  $\beta$ -defensins, protegrins, serprocidins, magainins, PR-39, cecropins and others (Martin et al. (1995) J. Leukocyte Biol. 58:128-136).

The invention relates to the variants of the peptide or fragments thereof comprehensively described above. These variants as well as the peptide and the fragments can also be designated collectively in this application as "peptide (fragments)".

The invention further relates to an antimicrobial agent comprising as active component ubiquicidine and/or peptide fragments thereof, derivatives of one of both and/or hybrid molecules containing at least ubiquicidine



or other antimicrobial cationic peptides and/or peptide fragments thereof and/or derivatives thereof for use in the diagnostics, prophylaxis, monitoring or therapy of infections.

5       The antimicrobial agent according to the invention can contain only the active component or take the form of a pharmaceutical composition in which one or more other carriers, diluents and the like are present. The agent and the composition can have different forms of adminis-  
10       tration, such as for instance tablet, pill, capsule, injection, infusion, suppository, powder, suspension, solution, spray, emulsion, ointment, aerosol, plaster or cream and can be used for oral, anal, nasal, vaginal, intramuscular, subcutaneous, intravenous, intraperitoneal  
15       or local (topical) administration or administration by means of a catheter via natural or artificial body openings. Other very specific examples of forms of administration are toothpaste, tooth varnish and catheters coated with the active compound. These latter have a  
20       prophylactic action.

      Compositions according to the invention can be prepared by combining (i.e. mixing, dissolving et cetera) of the active component(s) with pharmaceutically and pharmacologically acceptable excipients with a neutral  
25       character (such as aqueous or non-aqueous solvents, stabilizers, emulsifiers, detergents, additives), and further, where necessary, colorants, aromatic substances and/or flavourings. The concentration of the active component(s) in a pharmaceutical composition can vary  
30       between 0.001% and 100% (w/v), depending on the nature of the treatment and the manner of administering. The dose for administering likewise depends on the manner of administration and nature of the treatment. For the mouse for instance a dose of 1 to 10  $\mu\text{g/kg}$ , for instance 4  
35        $\mu\text{g/kg}$  body weight, is suitable. The compositions according to the invention are suitable for treatment of both humans and animals.

      The invention further relates to the ubiquicidine, to peptide fragments thereof, to derivatives of one of  
40       both and to hybrid molecules containing at least ubiqui-

cidine or other antimicrobial cationic peptides, and/or peptide fragments thereof and/or derivatives thereof for use in diagnostics, prophylaxis, therapy or monitoring of infections.

- 5        Infections, which can be treated with the agent are for instance disorders caused by pathogenic Gram-positive (Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes including antibiotic-resistant strains of S.aureus (also called Multidrug-Resistant S.aureus (MRSA))), and Gram-negative
- 10    ((antibiotic-resistant) Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, enterococci and Salmonella typhimurium) bacteria, micro-organisms difficult to treat such as Mycobacterium avium and Mycobacterium fortuitum, fungi such as
- 15    Candida albicans, Cryptococcus neoformans and Aspergillus fumigatis, viruses, in particular enveloped viruses, and parasites, such as Trypanosoma cruzi and Toxoplasma gondii. The use of the agent is however not limited to the infections stated here.

- 20        Because the peptide (fragment) according to the invention is infection-seeking, it can be applied very well in the diagnostics of infections and pathology related thereto. If provided with a detectable label, for instance a radioactive label such as technetium 99m, it is possible for instance by means of scintigraphy to
- 25    determine some time after administering where in the body the peptide (fragment) is situated. This will also be the site where the infection for treatment is situated. Such a labelled peptide (fragment) therefore has a dual purpose. Not only is demonstrated where the infection is
- 30    situated, but the peptide (fragment) will also exert an antibiotic action due to its presence at the site and thus reduce the infection. In this manner the effect of the treatment can also be followed by looking at the localization of the peptide in time. This is called
- 35    "monitoring".

- Each of the above mentioned radionuclides can in principle be used. Particularly recommended however is technetium 99m (<sup>99m</sup>Tc). The physical half-life of this radionuclide amounts to 6 hours and, together with the
- 40    fact that particularly gamma radiation is emitted, this

means a low radiation load for the patient. The relatively short half-life moreover has the clinical advantage that the examination can be repeated rapidly. In addition, this radionuclide is readily obtainable via the commercially available Mo-Tc-nuclide-generator.

It is found that peptide (fragments) labelled with technetium 99m can already be detected after 15 minutes at the site of the infection. The accumulation of for instance gallium 67 takes at least 24 hours. Owing to the very rapid localization of peptide (fragments) labelled with technetium 99m, a rapid diagnosis is possible. Furthermore, technetium 99m is mainly a  $\gamma$  emitter with a very small quantity of the much more harmful  $\beta$  radiation, so there is a relatively low radiation load for the patient. A more frequent administration is hereby possible. In addition, it has also been found that labelling with technetium 99m has no adverse influence on the action of the peptide (fragment). In laboratory animal experiments no adverse effects or changed external characteristics due to  $^{99m}\text{Tc}$ -labelled peptide (fragments) have been found up to the present. In vitro studies have moreover shown that very high concentrations of the antimicrobial peptide (fragments) are not toxic for human body cells. Particular recommended therefore according to the invention as hybrid molecules are technetium 99m-labelled cationic peptides and fragments or derivatives thereof.

The peptide (fragments) according to the present invention demonstrate the infection itself and thus the location where the micro-organism is situated in the body. Known image-forming methods for detecting infections, such as X-ray, echography and the like are aimed at demonstrating morphological changes which are the result of an infection. It is very well possible however for the infection itself to have already disappeared, while the morphological change still exists. In that case the treatment of the infection with for instance antibiotics is simply continued while this is in fact no longer necessary. It is recommended in principle to cause a treatment with a determined antimicrobial agent to be as

short as possible in respect of the occurrence of resistances or allergies as a result of the agent. The peptide (fragments) according to the invention are infection-seeking and therefore make their way to the site of the infection itself and can also be made visible there. As soon as the infection has disappeared, this is shown by the fact that the peptide (fragment) no longer accumulates at the site of the (former) infection. The treatment can then be stopped. Using labelled peptides, infections can also be distinguished from inflammation processes. Infections occur when the body reacts to the presence of a foreign living organism. "Inflammation" is a general name for reactions of the body to foreign stimuli, such as particles, molecules, but also live bacteria. The peptide only reacts in the case of infections.

The invention further relates to combination preparations which, in addition to ubiquicidine and/or a peptide fragment thereof and/or a derivative thereof and/or a hybrid molecule, contain one or more other active components. Combinations with "classic" antibiotics or with antiviral or antifungal agents can for instance be envisaged.

The invention further relates to a method for labelling antimicrobial peptides, particularly cationic peptides, more particularly ubiquicidine and peptides derived therefrom and defensins. Such a method comprises of placing the peptide for labelling in contact with a tin(II) salt, a borohydride and a radioactive label in the presence of alkali, as described in Pauwels et al. (Nucl. Med. Biol. 20, 825-833 (1993)), but wherein the peptide is modified with MAG3 (mercapto-acetyl glycine-glycine-glycine). Prior to labelling the modified peptide is held at about 100°C for 10 minutes. Particularly in the case of small peptides or peptides carrying no sulphur groups, the MAG3 modification results in considerably higher labelling efficiencies.

The whole is stirred at a suitable temperature for a determined time, for instance 1 to 60 minutes, preferably 5 to 30 minutes. The temperature depends on the tempera-

ture sensitivity of the peptide, but will usually lie between room temperature and 40°C, and will preferably be about 37°C.

The tin(II) salt is preferably tin(II)pyrophosphate.  
5 The borohydride is preferably sodium borohydride or potassium borohydride. The tin(II) salt and the borohydride are advantageously used in a ratio between 1:1 and 1:10, preferably 1:4 in quantities of respectively 0.5-5 µl and 2-10 µl. In preference 0.1 M sodium hydroxide is  
10 used as alkali.

The radioactive label is advantageously <sup>99m</sup>Tc-per-technetate, but <sup>186</sup>Re-perrhenate can also be used. Standard solutions of such radioactive labels are commercially available. In the method according to the invention  
15 0.05-0.5 ml, preferably 0.1 ml of such a solution is used.

A particularly advantageous manner of preparing ubiquicidine, and optionally the fragments, derivatives and hybrid molecules, is by means of transgenic animals.  
20 For this purpose the method comprises of transforming an animal egg-cell with a gene construct which codes for the ubiquicidine, peptide fragment, derivative or hybrid molecule, regenerating a transgenic animal from the transformed egg-cell and isolating the ubiquicidine,  
25 peptide fragment, derivative or hybrid molecule from a tissue or bodily fluid of the animal, for instance milk. The products can of course also be synthesized.

The present invention will further be elucidated on the basis of the accompanying examples, which are only  
30 given by way of illustration but do not limit the invention. Reference is made in the examples to the following figures, in which:

- Figure 1 shows the amino acid sequence of ubiquicidine and derived peptides  
35 Figure 2 shows the antimicrobial effect of ubiquicidine in respect of Klebsiella pneumoniae and Staphylococcus aureus  
Figure 3 shows the effect of ubiquicidine (18-35) on herpes simplex virus infection of Vero cells

- Figure 4 shows the effect of ubiquicidine (18-35) on *Mycobacterium fortuitum*
- Figure 5 shows the effect of ubiquicidine (18-35) and ubiquicidine (18-29) on (antibiotic-resistant) *Staphylococcus aureus*
- Figure 6 shows the effect of ubiquicidine (18-35) and D-alanine-protected ubiquicidine (18-35) on *Klebsiella pneumoniae*
- Figure 7 shows the speed of ubiquicidine (18-35) and D-alanine-protected ubiquicidine (18-35) with which *Staphylococcus aureus* is eliminated
- Figure 8 shows the effect of ubiquicidine (18-35) and D-alanine-protected ubiquicidine (18-35) on (antibiotic-resistant) *Staphylococcus aureus*
- Figure 9 shows the effect of D-alanine-protected ubiquicidine (18-35) on (antibiotic-resistant) *Escherichia coli*
- Figure 10 is a scintigram of intraperitoneally administered <sup>99m</sup>technetium-labelled ubiquicidine (18-35) in a mouse infected with *Staphylococcus aureus*
- Figure 11 is a schematic view of the experimental infection and treatment of mice
- Figure 12 shows the accumulation of <sup>99m</sup>technetium-labelled ubiquicidine (18-35), ubiquicidine (1-18), defensins and human IgG in the thigh muscle infected with *Klebsiella pneumoniae*
- Figure 13 shows the accumulation of <sup>99m</sup>Tc-labelled ubiquicidine 18-35 in a nidus but not in inflammations
- Figure 14 shows the effect of ubiquicidine (18-35), ubiquicidine (1-18) and defensins on an experimental infection with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*
- Figure 15 shows the antimicrobial effect of ubiquicidine 29-41 and 18-35 and defensin-1 in mice

**EXAMPLES****EXAMPLE 1****Antimicrobial action of ubiquicidine****1. Introduction**

5 By means of gel filtration and reverse phase HPLC a peptide was isolated from the cytosol fraction of murine RAW 264.7 macrophages activated with interferon  $\gamma$  and cells of the human H292 bronchial epithelial cell line stimulated in different ways. The latter could be stimu-  
10 lated with bacterial products (endotoxin, lipoteichoic acid), phorbol ester, and bronchial pathogens (Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae and para-influenza virus 3). The isolated peptide was called ubiquicidine.

15

**2. Materials and method****2.1. Isolation of ubiquicidine**

The method of isolating ubiquicidine from cytosol fractions of cells has been previously described for the  
20 isolation of antimicrobial proteins from cell lysates and cell membrane fractions (Hiemstra et al. (1993) Infect. Immun. 61:3038-3046). The cells were cultured in RPMI 1640 medium with antibiotics and 10% heat-inactivated foetal calf serum. The cells were subsequently har-  
25 vested, washed and resuspended in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) enriched with a cocktail of protease inhibitors.

Using nitrogen cavitation, a cell lysate was obtained whereafter by means of ultracentrifugation at  
30 27,000xg a membrane fraction and a cytosol fraction were obtained. The proteins in the cytosol fraction were extracted using 5% acetic acid and the acid extract was dialyzed and subsequently placed on a P60 column.

The fractions originating from this column were  
35 tested for antimicrobial activity. The ubiquicidine-containing fractions were pooled and further separated by means of HPLC on a C18 column with heptafluorobutyric acid as "ion pairing molecule" in the eluent. The HPLC fractions were likewise tested for antimicrobial activity  
40 and immunoreactivity using an antiserum against the N-

terminal part of the ubiquicidine. The pooled fractions contain pure ubiquicidine.

## 2.2. Biochemical characterization

5       The sequence of the N-terminal amino acids of purified ubiquicidine was determined by means of automated Edman degradation and a peptide sequencer 477A equipped with a PTH amino acid analyzer 120A (Applied Biosystems, Foster City, CA). The sequence results were subsequently  
10 analysed using the GeneWorks software package (Intelligenetics, Mountain View, CA). Molecular weight of ubiquicidine was determined using mass spectrometry (laser desorption time-of-flight mass spectrometry; Lasermat, Finnigan MAT LTD, Hemel Hempstead, UK). For the immuno-  
15 logical identification of ubiquicidine use was made of a rabbit antiserum specific to the N-terminal part of ubiquicidine (ubiquicidine 1-18) and Western blotting.

## 2.3. Tests for antimicrobial activity in vitro

20       Different techniques were used to test for the antimicrobial activity of ubiquicidine and peptides derived therefrom. The gel overlay assay and the radial diffusion assay have been previously described (Hiemstra et al. (Infect. Immun. 63, 3038-3046 (1993))). In the  
25 growth-killing curve determination which was used to investigate the IC 99% of the peptide, (mid-log or stationary phase) bacteria (Klebsiella pneumoniae (A) and Staphylococcus aureus (B) were exposed for 60 minutes at 37°C to increasing concentrations of the ubiquicidine,  
30 whereafter the number of living bacteria in the suspension was determined using microbiological plate techniques (Colony Forming Units, CFU). As negative controls, bacteria were exposed to peptide 4 (a synthetic peptide derived from HIV glycoprotein 120), ubiquicidine (18-29)  
35 or no peptide.

The results of such experiments are shown in CFUs in Figure 2.



### 3. Result

The ubiquicidine is a 6.7 kD ribosomal cationic peptide with a pI of 12.67. From sequence determination of the 18 N-terminal amino acids of the isolated peptide, it was found that these corresponded wholly with the N-terminal part of the S30 part of the expression product of the Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma associated ubiquitously expressed (FAU) gene which occurs inter alia in humans and mice. The molecular weight of the FAU S30 and the ubiquicidine were also found to correspond. It is therefore assumed that it is the same peptide.

From the determination of the in vitro antimicrobial action of ubiquicidine it was found that the ubiquicidine can kill micro-organisms very rapidly (< 10 minutes) and effectively (3-4 log reduction). Figure 2 shows mid-log Klebsiella pneumoniae (A) and Staphylococcus aureus (B), which were exposed for 60 minutes at 37°C to increasing concentrations of purified ubiquicidine in 10 mM sodium phosphate buffer. In the control incubations the bacteria multiplied a number of times (not shown). The minimal inhibiting concentration for said micro-organisms was found to lie between 0.08 and 0.16  $\mu$ M, 1.5  $\mu$ M ubiquicidine eliminates Klebsiella pneumoniae (A) almost completely, while the reduction in the number of Staphylococcus aureus (B) amounts to 2 log.

### EXAMPLE 2

#### Antimicrobial action of peptide fragments

##### 1. Introduction

A number of peptide fragments were derived from the native ubiquicidine and the antimicrobial activity thereof was determined.

##### 2. Materials and methods

##### 2.1. Production of synthetic peptides

Peptides were prepared using an Abimed AMS multiple peptide synthesizer and a fixed phase (tentagel AC, a polymer of polyethylene glycol spacer linked to a polystyrene matrix) (de Koster et al. (1995) J. Immunol. Methods 187:179-188). After completion of the synthesis

the peptide was released from the fixed phase using a trifluoroacetic acid water(19:1) mixture and the peptides were subsequently precipitated with an ether pentane(1:1) mixture at 20°C. After centrifugation the obtained peptides were dried at 40°C for 15 minutes. The peptides were subsequently dissolved in 10% acetic acid and concentrated by means of vacuum centrifugation. The purity of the peptides was determined using HPLC. An overview of the synthesized peptides derived from ubiquicidine is given in Figure 1. The antimicrobial activity of these peptide fragments was determined as described in Example 1 under 2.3.

#### 2.2. Antimicrobial effect on Herpes Simplex Virus (HSV)

HSV was incubated for 60 minutes with increasing concentrations of the peptide fragment ubiquicidine (18-35) at 37°C. The virus preparation was subsequently added to Vero cells in diverse dilutions. After 3 days at 37°C the cytopathogenic effect of the virus on Vero cells was determined, with finally made it possible for the virus titre to be calculated. Figure 3 shows the result.

#### 2.3. Antimicrobial effect on Mycobacterium fortuitum

About  $10^6$  Mycobacterium fortuitum were incubated for different intervals at 37°C with 14  $\mu$ M or 52  $\mu$ M ubiquicidine (18-35) and the number of living mycobacteria in the suspensions was then determined using microbiological techniques. The result is shown in Figure 4.

#### 2.4. Antimicrobial effect on Staphylococcus aureus

About  $10^6$  bacteria of multidrug resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and antibiotic-sensitive S. aureus were exposed for 60 minutes at 37°C to different concentrations of ubiquicidine (18-35), whereafter the number of living bacteria in the suspensions was determined microbiologically. As negative control high concentrations of ubiquicidine (18-29), peptide 4 and no peptide were used. The result is shown in Figure 5.

### 3. Results

Research into the effect of the different peptides on Klebsiella pneumoniae and Staphylococcus aureus demonstrated antimicrobial activity of ubiquicidine (1-18),  
5 ubiquicidine (18-35) and ubiquicidine (29-41). The other peptides were found to be considerably less potent or inactive.

Figure 3 shows the results of the experiment with HSV. This shows that an increasing concentration of  
10 peptide results in a decrease in the virus titre.

Figure 4 shows that ubiquicidine (18-35) kills M. fortuitum for a period of 3 hours, whereafter the peptide then shows a bacteriostatic effect. Repeated administration at 3 and 7 hours after the first dose results in  
15 practically complete elimination of the mycobacteria. In the control incubations M. fortuitum was found to proliferate. In additional control experiments no indication was found for agglomeration of the mycobacteria due to ubiquicidine (18-35) (not shown).

20 Figure 5 shows that the peptide fragment ubiquicidine (18-35) results in a marked decrease in the number of CFUs of different Staphylococcus aureus strains.

#### EXAMPLE 3

#### 25 Modified peptide fragments and their activity

##### 1. Introduction

A number of the peptide (fragments) described in Example 2 was further modified in different ways by adding an extra D-alanine at the beginning and/or end as  
30 protection against exopeptidase activity. The antimicrobial activity of several "derivatives" obtained in this manner was likewise determined.

##### 2. Materials and methods

#### 35 2.1. Production of modified peptides

D-alanine-protected peptides were prepared as described above (Example 2, ad 2.1) in this application.

#### 2.2. Antimicrobial effect on Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus ( $5 \times 10^5$  bacteria) was exposed for different periods at 37°C to 7  $\mu$ M ubiquicidine (18-35) and D-alanine-protected ubiquicidine (18-35), whereafter the number of living bacteria in the suspension was quantified microbiologically.

In addition, different strains of (multidrug resistant) Staphylococcus aureus were incubated for 60 minutes at 37°C with increasing concentrations of D-alanine-protected and unprotected ubiquicidine (18-35), whereafter the number of living bacteria in the different suspensions was determined microbiologically.

### 2.3. Antimicrobial effect on Klebsiella pneumoniae

About  $5 \times 10^6$  Klebsiella pneumoniae were exposed for 60 minutes at 37°C to increasing concentrations of ubiquicidine (18-35) and D-alanine-protected ubiquicidine (18-35) and the number of live bacteria was subsequently measured microbiologically.

### 2.4. Antimicrobial effect on Escherichia coli

About  $10^6$  antibiotic-resistant Escherichia coli and antibiotic-sensitive E. coli (parent strain of the resistant bacteria) were exposed for 60 minutes at 37°C to increasing concentrations of D-alanine-protected ubiquicidine (18-35), whereafter the number of living bacteria was determined microbiologically.

## 3. Results

Comparison of antimicrobial activities of the D-alanine-protected and the unprotected ubiquicidine (18-35) in respect of Klebsiella pneumoniae in vitro showed that the D-alanine-protected variant is much more potent in eliminating the bacteria than the unprotected ubiquicidine (18-35) peptide (Figure 6).

The maximum killing effect by both variants of ubiquicidine (ubiquicidine (18-35) and D-alanine-protected ubiquicidine (18-35)) on Staphylococcus aureus was achieved within 15 minutes (Figure 7). The speed of elimination of Staphylococcus aureus bacteria by the two types of ubiquicidine peptide is identical (Figure 7).

The results further demonstrated that the D-alanine-protected ubiquicidine kills (multidrug resistant) Staphylococcus aureus more effectively than the unprotected variant (Figure 8).

5        Very surprising is the observation that the D-alanine-protected ubiquicidine (18-35) can kill antibiotic-resistant Escherichia coli much more effectively than the antibiotic-sensitive parent strain of Escherichia coli (Figure 9). 1  $\mu$ M D-alanine-protected ubiquicidine reduces  
10 the number of antibiotic-resistant bacteria to below the detection limit. A comparable antimicrobial effect relative to the parent strain is only achieved with 14  $\mu$ M of the peptide. This data shows that antibiotic-resistant bacteria can be eliminated very effectively by peptides  
15 derived from ubiquicidine.

#### EXAMPLE 4

##### Peptide fragments labelled with Technetium 99m

###### 1. Introduction

20        A hybrid molecule was prepared by labelling the peptide fragments with the emitter  $^{99m}\text{Tc}$ . This example illustrates the manner of labelling according to the invention.

###### 25    2. Materials and method

Labelling of peptide D (ubiquicidine (18-35)) and the D-alanine-protected ubiquicidine (18-35) with  $^{99m}\text{Tc}$  was performed using a method according to the invention. For this purpose 10  $\mu$ l of a MAG3-derived peptide solution  
30 (2 mg/ml in 0.01 M sodium phosphate pH 3.0) was added to 2  $\mu$ l of a tin(II)pyrophosphate solution (0.5 mg/ml). Immediately thereafter 4  $\mu$ l of a 10 mg/ml  $\text{KBH}_4$  solution (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo, US) in 0.1 M NaOH was added. After adding 0.1 ml of a  $^{99m}\text{Tc}$  sodium pertechnetate solution (20 MBq, Mallinckrodt Medical B.V.,  
35 Petten, Netherlands) the mixture was stirred at room temperature for 30 minutes.

The radiochemical purity of peptides labelled with  $^{99m}\text{Tc}$  was determined after precipitation with 20% trichloroacetic acid (TCA), instantaneous thin-layer chromatog-  
40

raphy (ITLC) and HPLC. Summarizing, this took place by analysing 20  $\mu$ l of a freshly prepared  $^{99m}\text{Tc}$ -defensin-1 or  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG on a superose 12 column (Pharmacia, Upsala, Sweden), linked to an LKB Bromma HPLC 2249 chromatography pump (LKB, Upsala, Sweden) and an on-line NAI (Tl)-crystal-gamma-detection system (Raytest Steffi, Germany). The buffer which was used for analysing the  $^{99m}\text{Tc}$ -labelled compounds was 14 mM sodium phosphate-buffered salt solution (PBS) pH 7.5 with a flow rate of 1 ml/minute. Labeling yields of  $^{99}\text{Tc}$ -labelled peptides were determined after precipitation with 20% TCA, HPLC analysis and ITLC analysis and were respectively more than 90%, more than 90% and more than 95%.

## 15 **EXAMPLE 5**

### Accumulation of the labelled peptide at the site of infection

#### 1. Introduction

In order to demonstrate that the peptide (fragment) according to the invention is infection-seeking, the localization of  $^{99}\text{Tc}$ -labelled peptides (ubiquicidine (18-35), ubiquicidine (1-18) and defensins in addition to IgG as control) was determined using a  $\gamma$ -camera.

#### 25 2. Materials and method

Mice were infected intramuscularly with about  $10^6$  Staphylococcus aureus bacteria (ATCC 25923) and subsequently injected intraperitoneally with 25  $\mu\text{g}$   $^{99m}\text{Tc}$ -peptide. Mice were also injected intramuscularly with about  $1 \times 10^8$  heat-killed (1 hour,  $100^\circ\text{C}$ ) S. aureus, 1  $\mu\text{g}$  endotoxin or 100 ng phorbol myristate acetate (PMA) in order to cause sterile inflammations. At different points in time after injection of the peptide the radioactivity was measured in the circulation (heart), determined organs (liver, kidney, bladder and spleen) and in both thigh muscles using a  $\gamma$ -camera. Accumulation of the labelled peptide at the site of infection in the right thigh muscle is shown in Figure 10.

### 3. Results

The results showed a very short half-life of the peptides in the circulation, i.e.  $t_{\text{half}} < 15$  minutes. The largest part of the injected labelled peptides ( $> 60\%$ ) is removed via the liver, kidneys and bladder, but a part of the peptides (1-2% of the injected dose) arrives at the site of infection in the thigh muscle (Figure 10).

#### EXAMPLE 6

##### 10 Antimicrobial activity in vivo

###### 1. Introduction

The accumulation and antimicrobial activity in vivo of a number of ubiquicidine fragments was determined.

###### 15 2. Materials and methods

###### 2.1. Infection model

Reference is made to Figure 11 for a schematic view of the experimental infection and treatment of the mice. In summary, mice were infected intramuscularly in the right thigh muscle with about  $10^6$  bacteria and after 5 minutes injected intraperitoneally with about 25  $\mu\text{g}$  (labelled) peptide. At different points in time after injection of the peptide the animals were killed and the right thigh muscle was removed, homogenized, and finally the number of bacteria in the homogenate was determined using microbiological plate techniques, or accumulation of the labelled peptide was determined by means of a  $\gamma$ -camera. This test involved animals which were normal and immunocompromised (injection with cyclophosphamide, "total body" radiation).

###### 2.2. Infection-seeking effect of peptides according to the invention

Mice were infected in the right thigh muscle with Klebsiella pneumoniae and 25  $\mu\text{g}$   $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labelled ubiquicidine (1-18) or ubiquicidine (18-35) was subsequently injected intraperitoneally. At different points in time after injection of the peptide the amount of activity in the right (test) and left (control) thigh muscle of the mouse was measured using a  $\gamma$ -camera. The results are

shown in Figure 12 as a ratio of the values in the right thigh muscle and the left thigh muscle, i.e. "target to non-target ratio". For the purpose of comparison the results for human defensin and IgG are also shown. The target to non-target ratios for infections and sterile inflammations were also compared (Figure 13).

### 2.3. Effect of antimicrobial peptides on experimental infections

Mice were infected in the right thigh muscle with Klebsiella pneumoniae (A) or Staphylococcus aureus (B). 5 minutes later, 25 µg ubiquicidine (18-35) or ubiquicidine (1-18) was injected intraperitoneally. 24 hours after administering of the peptide the animals were killed and the number of bacteria in the right thigh muscle was quantified microbiologically. As positive control, animals were injected intraperitoneally with human defensin and as negative control with the solvent of the antimicrobial peptides. The result is shown in Figure 14. The mice were also injected with 150 mg cyclophosphamide/kg body weight. Four days afterwards the animals were infected in the right thigh muscle with K. pneumonia and a day later different quantities of ubiquicidine (18-35), ubiquicidine (29-41) or defensin-1 were injected intravenously. Twenty-four hours after administering of the peptide the animals were killed and the number of bacteria in the right thigh muscle was quantified microbiologically. As control, normal animals were treated in identical manner. The result is shown in Figure 15.

### 3. Results

The accumulation of the tested peptides was found to be maximal 4 hours after administration and subsequently decreases in the course of time (Figure 12). It is notable that the maximum accumulation of <sup>99</sup>Tc-ubiquicidine (1-18) and <sup>99</sup>Tc-ubiquicidine (18-35) is reached much sooner than <sup>99</sup>Tc-IgG. This observation implies that <sup>99</sup>Tc-ubiquicidine peptides can be of importance for faster diagnostics of infections. Comparable results were found when the



<sup>99</sup>Tc-peptide was administered intravenously 24 hours after infection.

The above stated pharmacological data shows that ubiquicidine (1-18) and ubiquicidine (18-35) accumulate rapidly in the infected thigh muscle. The results of our experiments into the effect of these peptides on the number of bacteria in the muscle demonstrate that ubiquicidine (18-35) eliminates bacteria more effectively than ubiquicidine (1-18) and defensins (Figure 12). These in vivo results correspond very well with the results of the in vitro experiments.

Figure 14 shows that particularly ubiquicidine (18-35) also has a marked bactericidal effect in vivo which is better than that of defensin.

The result in immunocompromised animals (Figure 15) shows that the bactericidal effect in vivo is determined by a direct bactericidal effect as well as by an immunomodulating effect.

\*\*\*\*\*

## CLAIMS

1. Use of ubiquicidine or optionally modified peptide fragments derived therefrom for the preparation of a drug for the treatment, diagnostics or prophylaxis of infections in humans and animals.

- 5        2. Peptide fragment derived from ubiquicidine and comprising a preferably continuous series of at least 3, preferably at least 8 amino acids from the amino acid sequence of ubiquicidine:

10        KVHGSLARAGKVRGQTPKVAKQEKKKKKTGRAKRRMQYNRRFVNVVPTFGKKKGPNANS.

3. Peptide fragment as claimed in claim 2 with one of the following amino acid sequences:

ubiquicidine (1-18)	KVHGSLARAGKVRGQTPK
ubiquicidine (29-41)	TGRAKRRMQYNRR
15        ubiquicidine (18-29)	KVAKQEKKKKKT
ubiquicidine (18-35)	KVAKQEKKKKKTGRAKRR
ubiquicidine (29-35)	TGRAKRR
ubiquicidine (42-59)	FVNVVPTFGKKKGPNANS
ubiquicidine (36-41)	MQYNRR

- 20        4. Derivative of ubiquicidine or of a peptide fragment as claimed in claim 2 or 3, which derivative has an amino acid sequence which is at least partly the reverse of the amino acid sequence of the corresponding original peptide (fragment) (so-called "(partial) reverse peptide").

25        5. Derivative of a ubiquicidine or of a peptide fragment as claimed in claim 2, 3 or 4, wherein at least one of the amino acids from the original peptide (fragment) is replaced by a stereoisomer of that amino acid.

- 30        6. Derivative of ubiquicidine or of a peptide fragment as claimed in claims 2-5, wherein the original amino acid chain is extended at one or both ends thereof with one or more groups, such as D-amino acids, protecting against degradation.

- 35        7. Derivative as claimed in claim 6 with the amino acid sequence:

D-A--KVAKQEKKKKKTGRAKRR--D-A

in which D-A represents D-alanine.

8. Hybrid molecule, comprising a cationic peptide with an antimicrobial action and/or a peptide fragment as claimed in claim 2 or 3 and/or a derivative thereof as claimed in claims 4-7, and one or more effector molecules.

9. Hybrid molecule as claimed in claim 8, wherein the effector molecule comprises an amino acid chain which is capable of binding to a micro-organism and/or substances secreted by micro-organisms or expressed on the surface thereof.

10. Hybrid molecule as claimed in claim 8, wherein the effector molecule is an endotoxin-binding peptide.

11. Hybrid molecule as claimed in claim 8, wherein the effector molecule is a detectable label.

12. Hybrid molecule as claimed in claim 11, wherein the detectable label is a radionuclide chosen from the group consisting of technetium 99m (Tc-99m), iodine 123 (I-123) and 131 (I-131), bromine 75 (B-75) and 76 (B-76), lead 203 (Pb-203), gallium 67 (Ga-67) and 68 (Ga-68), arsenic 72 (As-72), indium 111 (In-111), 113m (In-113m) and 114m (In-114m), ruthenium 97 (Ru-97), copper 62 (Cu-62), 64 (Cu-64) and 67 (Cu-67), iron 52 (Fe-52), manganese 52m (Mn-52m), chromium 51 (Cr-51), rhenium 186 (Re-186) and 188 (Re-188), terbium 161 (Tb-161), yttrium 90 (Y-90), fluorine 19 (F-19), sodium 23 (Na-23), phosphorus 31 (P-31), gadolinium 157 (Gd-157), manganese 55 (Mn-55), dysprosium 162 (Dy-162), chromium 52 (Cr-52) and iron 56 (Fe-56).

13. Hybrid molecule as claimed in claim 8, wherein the cationic peptide with antimicrobial activity is chosen from  $\alpha$ - and  $\beta$ -defensins, ubiquicidine, protegrins, serprocidins, magainins, PR-39, cecropins.

14. Peptide fragments as claimed in claim 2 and 3 for use in the diagnostics, prophylaxis or therapy of infections in humans and animals.

15. Derivatives as claimed in claims 4-7 for use in the diagnostics, prophylaxis or therapy of infections in humans and animals.

16. Hybrid molecules as claimed in claims 8-13 for use in the diagnostics, prophylaxis, therapy or monitoring of infections in humans and animals.

17. Peptide fragments as claimed in claim 14, derivatives as claimed in claim 15 or hybrid molecules as claimed in claim 16, wherein the microbial infections are caused by pathogenic Gram-positive (Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes including antibiotic-resistant strains of S.aureus (also called Multidrug Resistant S.aureus (MRSA)) and Gram-negative ((antibiotic-resistant) Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, enterococci and Salmonella typhimurium) bacteria, micro-organisms difficult to treat, such as Mycobacterium avium and Mycobacterium fortuitum, fungi, such as Candida albicans, Cryptococcus neoformans and Aspergillus fumigatis, viruses, in particular enveloped viruses, and parasites, such as Trypanosoma cruzi and Toxoplasma gondii.

18. Antimicrobial agent, comprising at least a suitable quantity of one or more active components chosen from ubiquicidine, peptide fragments as claimed in claims 2 and 3, derivatives as claimed in claims 4-7, hybrid molecules as claimed in claims 8-13, optionally in the presence of one or more suitable excipients.

19. Antimicrobial agent as claimed in claim 18 for use in therapy and prophylaxis in humans and animals.

20. Diagnostic agent, comprising a suitable quantity of one or more active components provided with a detectable label and chosen from ubiquicidine, peptide fragments as claimed in claims 2 and 3, derivatives as claimed in claims 4-7, hybrid molecules as claimed in claims 8-13.

21. Diagnostic agent as claimed in claim 19 for use in diagnostics and monitoring.

22. Method for labelling a cationic peptide with antimicrobial action, comprising of placing the peptide for labelling in contact with a tin(II) salt, a borohydride and a radioactive label in the presence of alkali, wherein the peptide is modified with MAG3 (mercaptoacetyl glycine-glycine-glycine).

23. Method as claimed in claim 22, wherein the tin(II) salt and the borohydride are respectively tin-(II)pyrophosphate and sodium borohydride or potassium borohydride, which are used in a ratio between 1:1 and 5 1:10, preferably 1:4, in quantities of respectively 0.5-5  $\mu$ l and 2-10  $\mu$ l, wherein the radioactive label is a standard solution of  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetate or  $^{186}\text{Re}$ -perrhenate in a quantity of 0.05-0.5 ml, preferably 0.1 ml, wherein the 10 alkali is sodium hydroxide and the alkali concentration is 0.5-5 M, preferably 0.1 M, and wherein the whole is stirred for 1 to 60 minutes, preferably 5 to 30 minutes at a temperature between room temperature and 40°C, and preferably at about 37°C.

24. Method for preparing ubiquicidine, peptide 15 fragments as claimed in claims 2 and 3, derivatives as claimed in claims 4-7, hybrid molecules as claimed in claims 8-13 by transforming an animal egg-cell with a gene construct which codes for the ubiquicidine, peptide fragment, derivative or hybrid molecule, regenerating a 20 transgenic animal from the transformed egg-cell and isolating the ubiquicidine, peptide fragment, derivative or hybrid molecule from a tissue or bodily fluid of the animal, for instance milk.

\*\*\*\*\*

1/17

**PEPTIDE**

Ubiquitin:  
(59aa, 6.654 kD) KVGSLARAGKVRGQTPKVAKQEKKKKKTGRAKRRMQYNRRFVNVPVPTFGKKKGPNANS

(1-18, 2.153 kD) KVGSLARAGKVRGQTPK

(29-41, 1.910 kD) TGRAKRRMQYNRR

(18-29, 1.643 kD) KVAKQEKKKKKT

(18-35, 3.477 kD) KVAKQEKKKKKTGRAKRR

(18-35, 3.656 kD) AKVAKQEKKKKKTGRAKRR

(29-35, 953 D) TGRAKRR

(42-59, 2.213 kD) FVNVPVPTFGKKKGPNANS

(36-41, 957 D) MQYNRR

FIG. 1

2/17

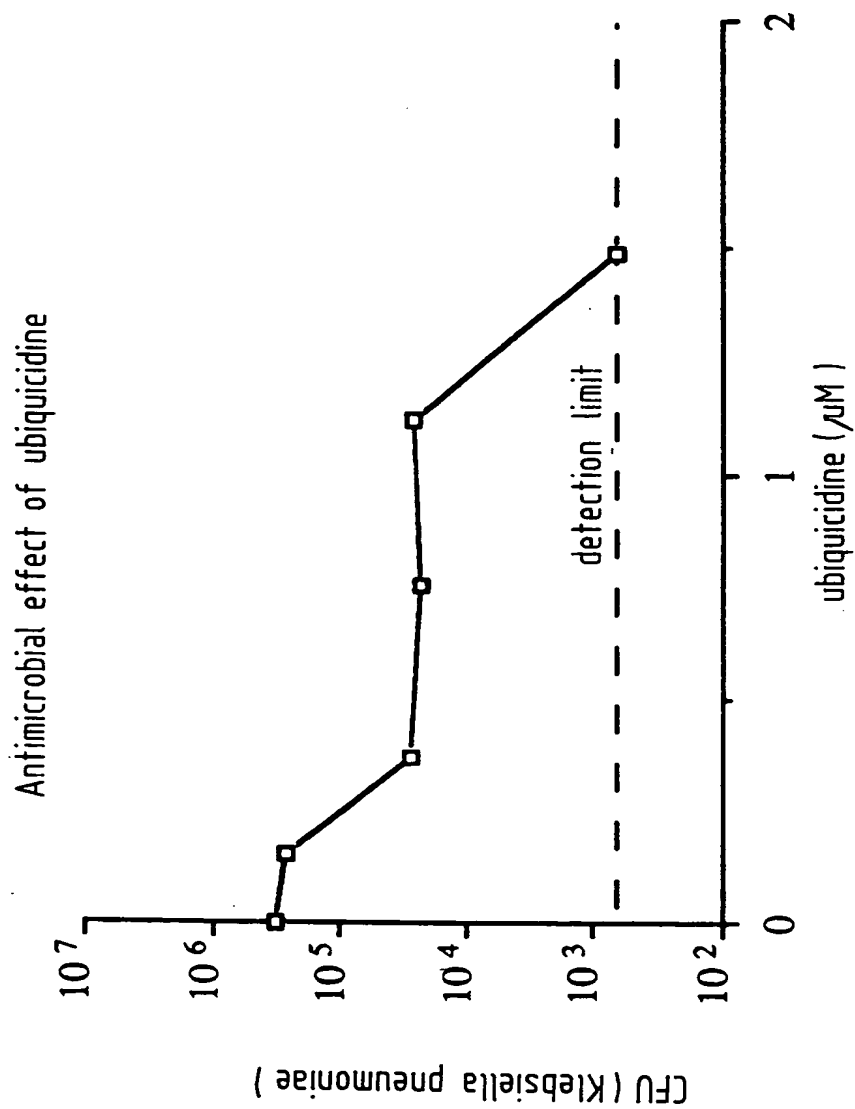


FIG. 2A

3/17

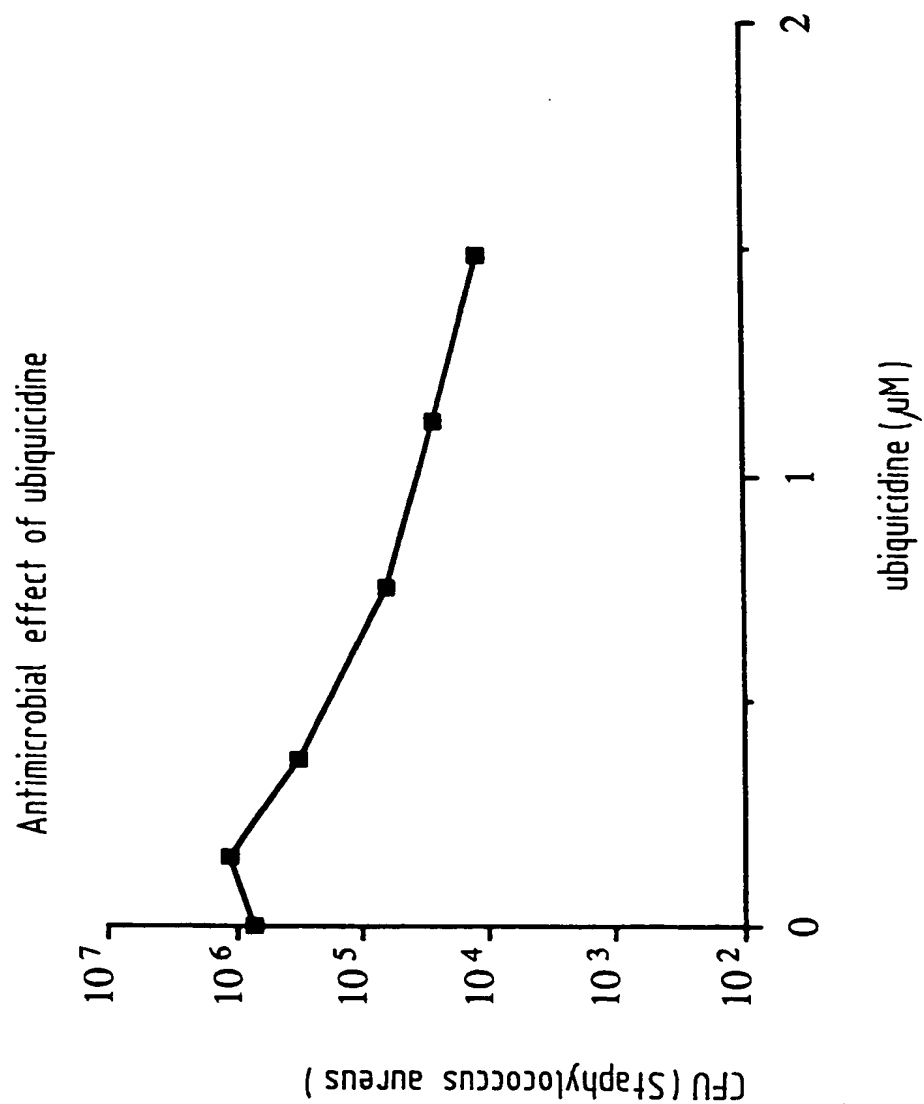


FIG. 2B



4/17

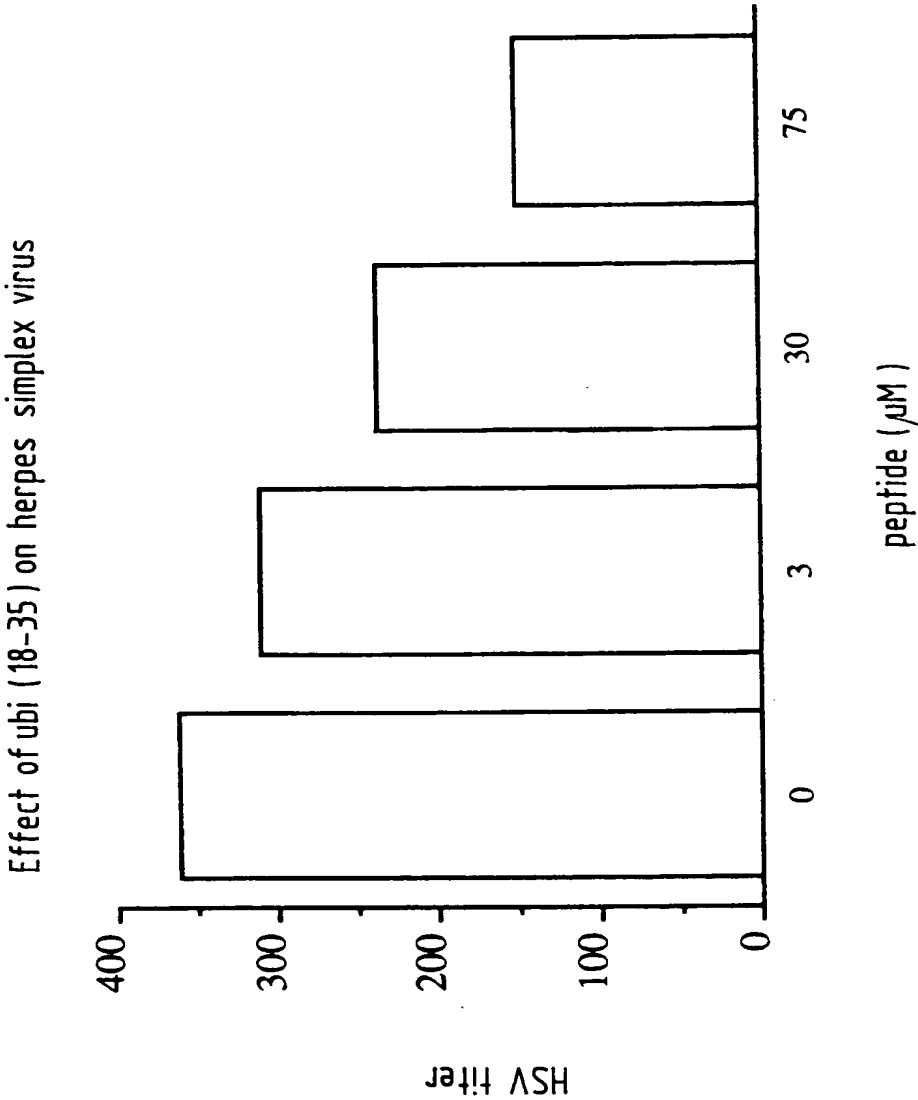


FIG. 3

5/17

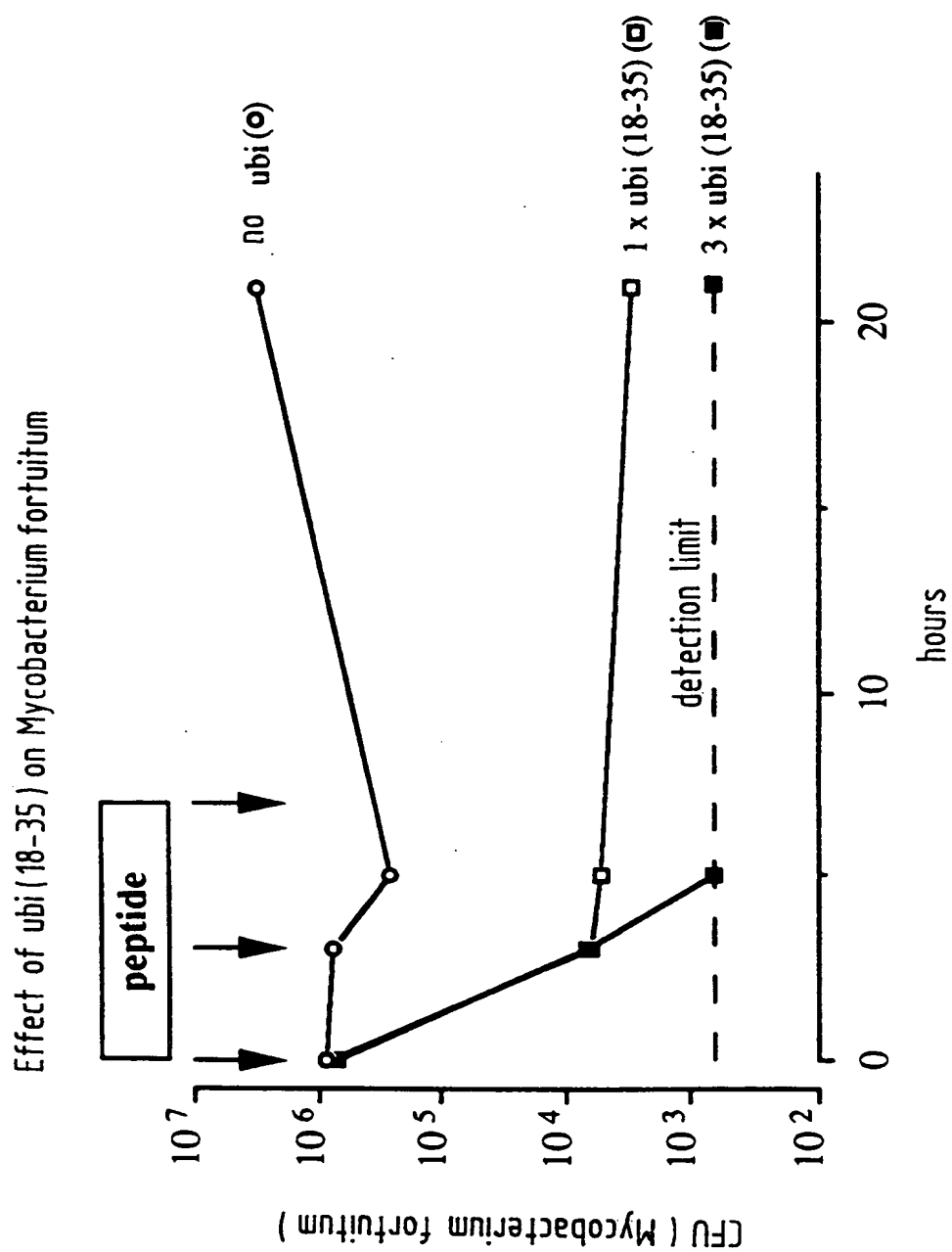


FIG. 4

6/17

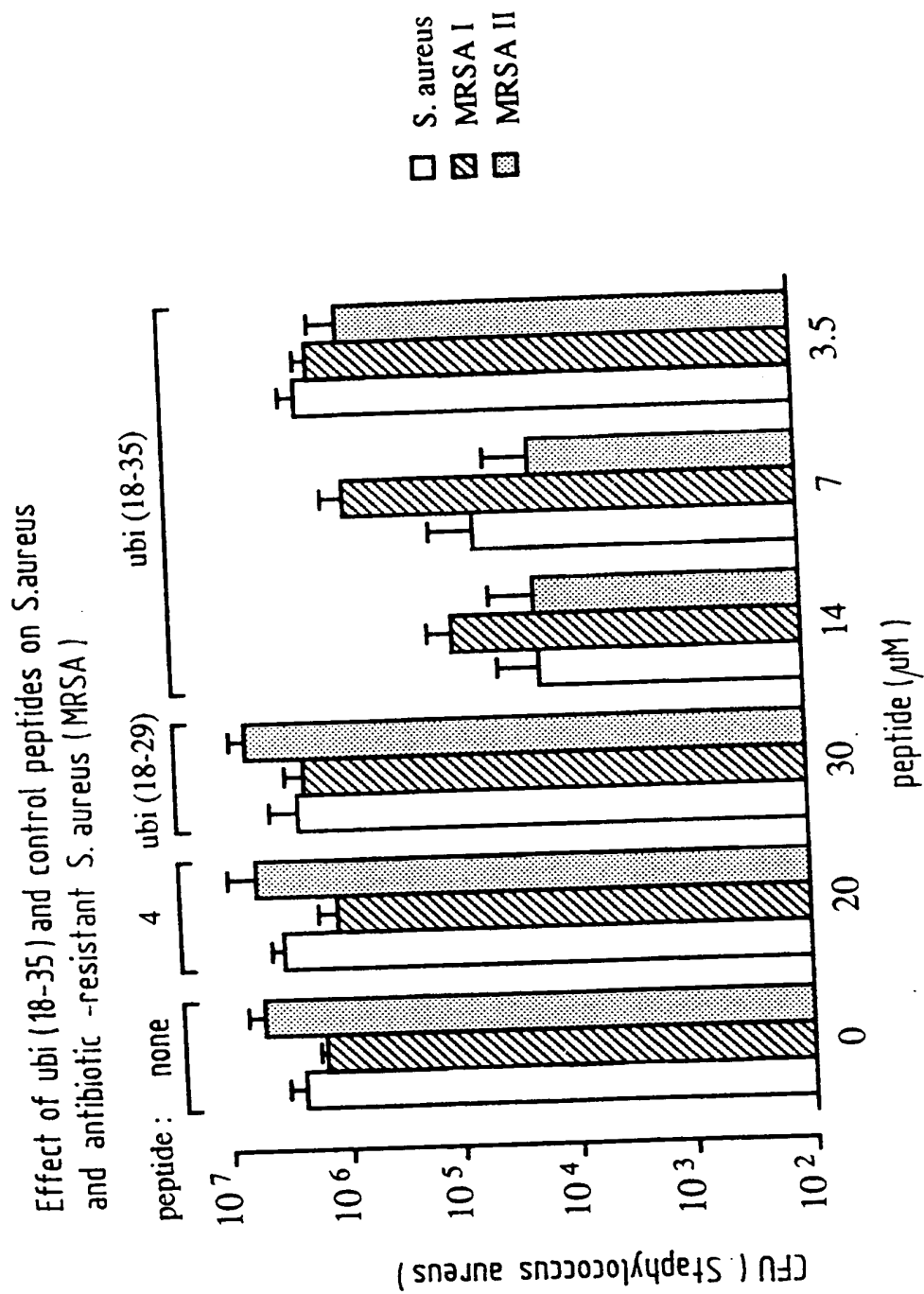
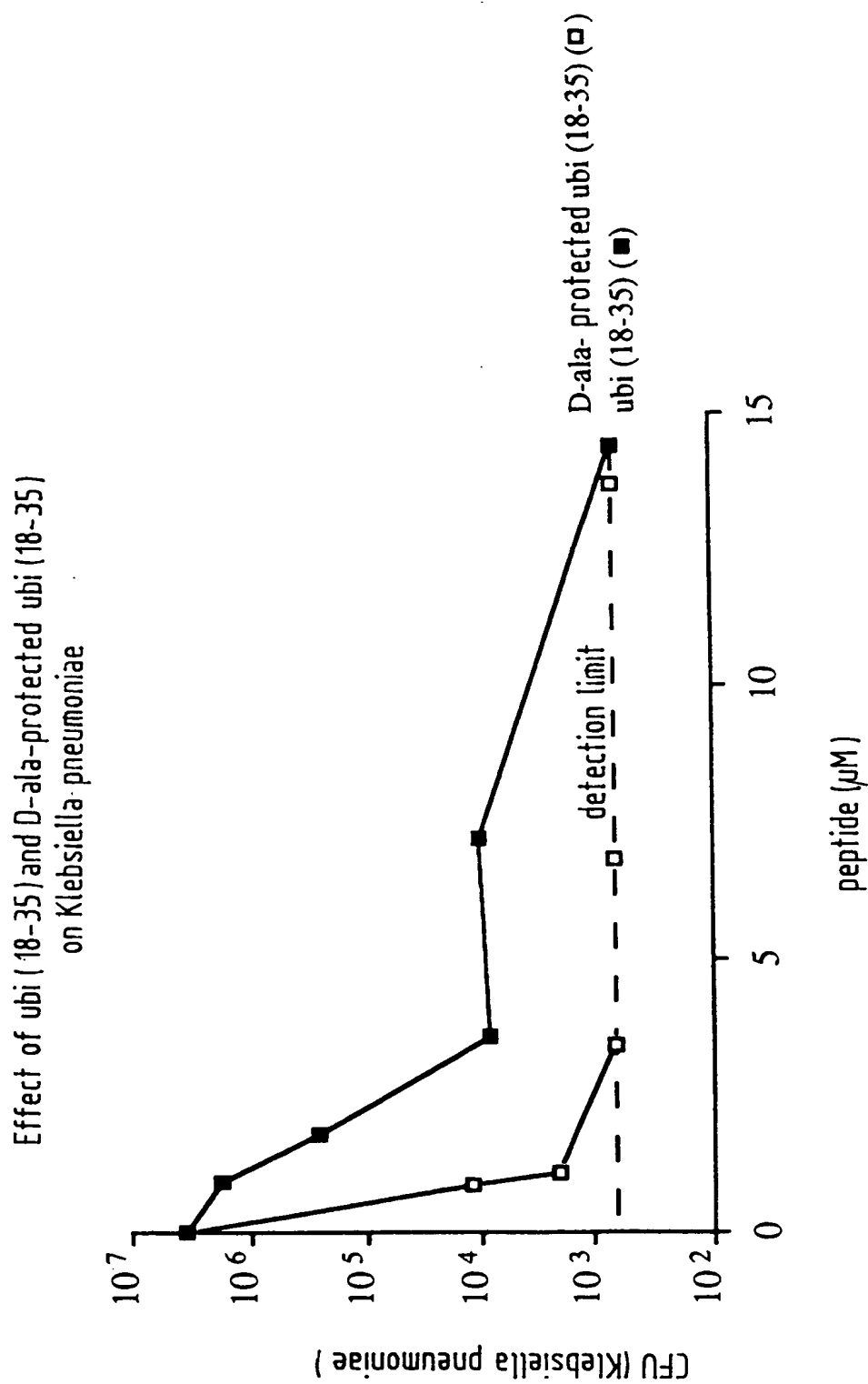


FIG. 5

7/17

FIG. 6

8/17

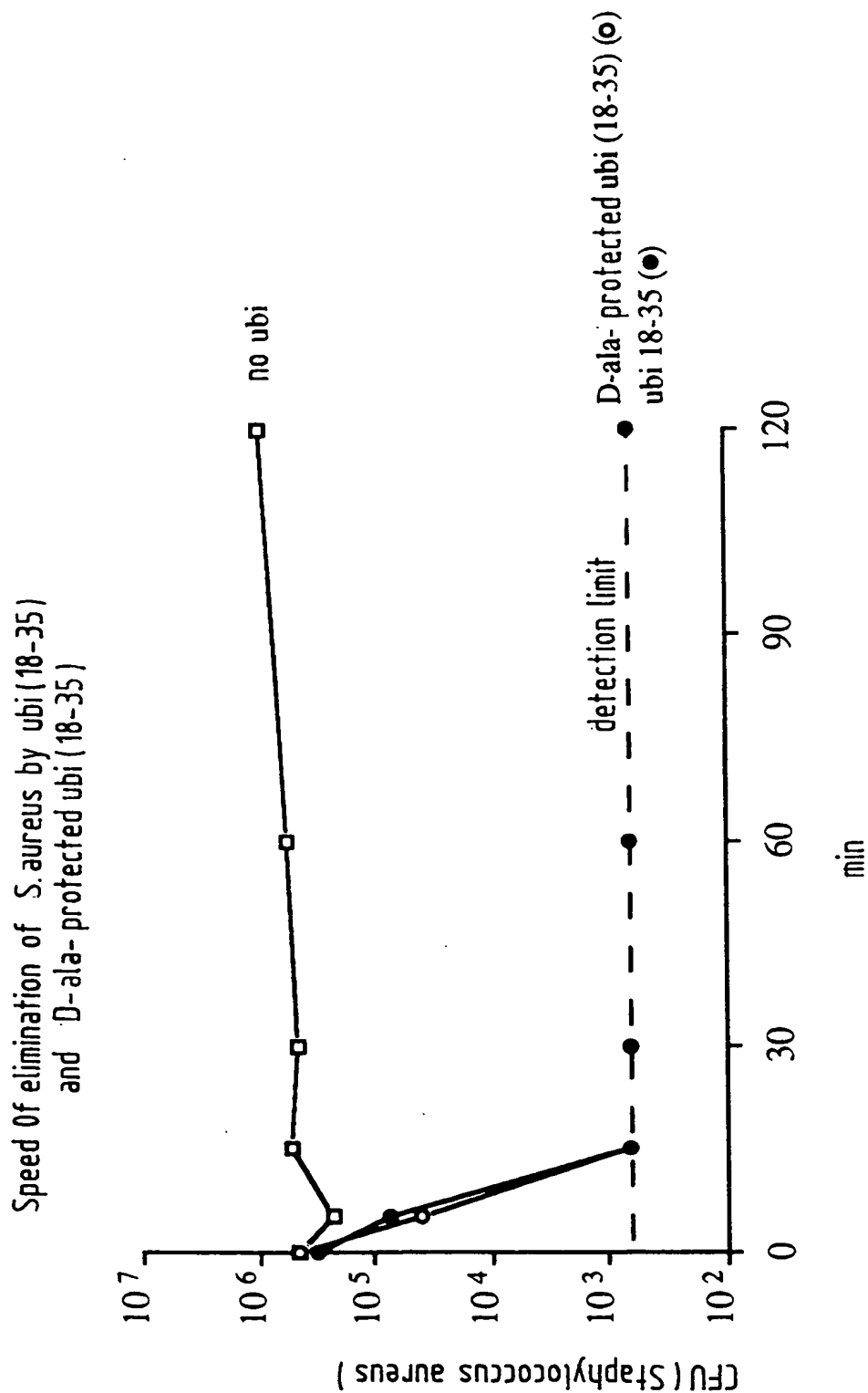


FIG. 7

9/17

Effect of ubi (18-35) and D-ala-protected ubi (18-35) on  
S.aureus and antibiotic-resistant S.aureus (MRSA)

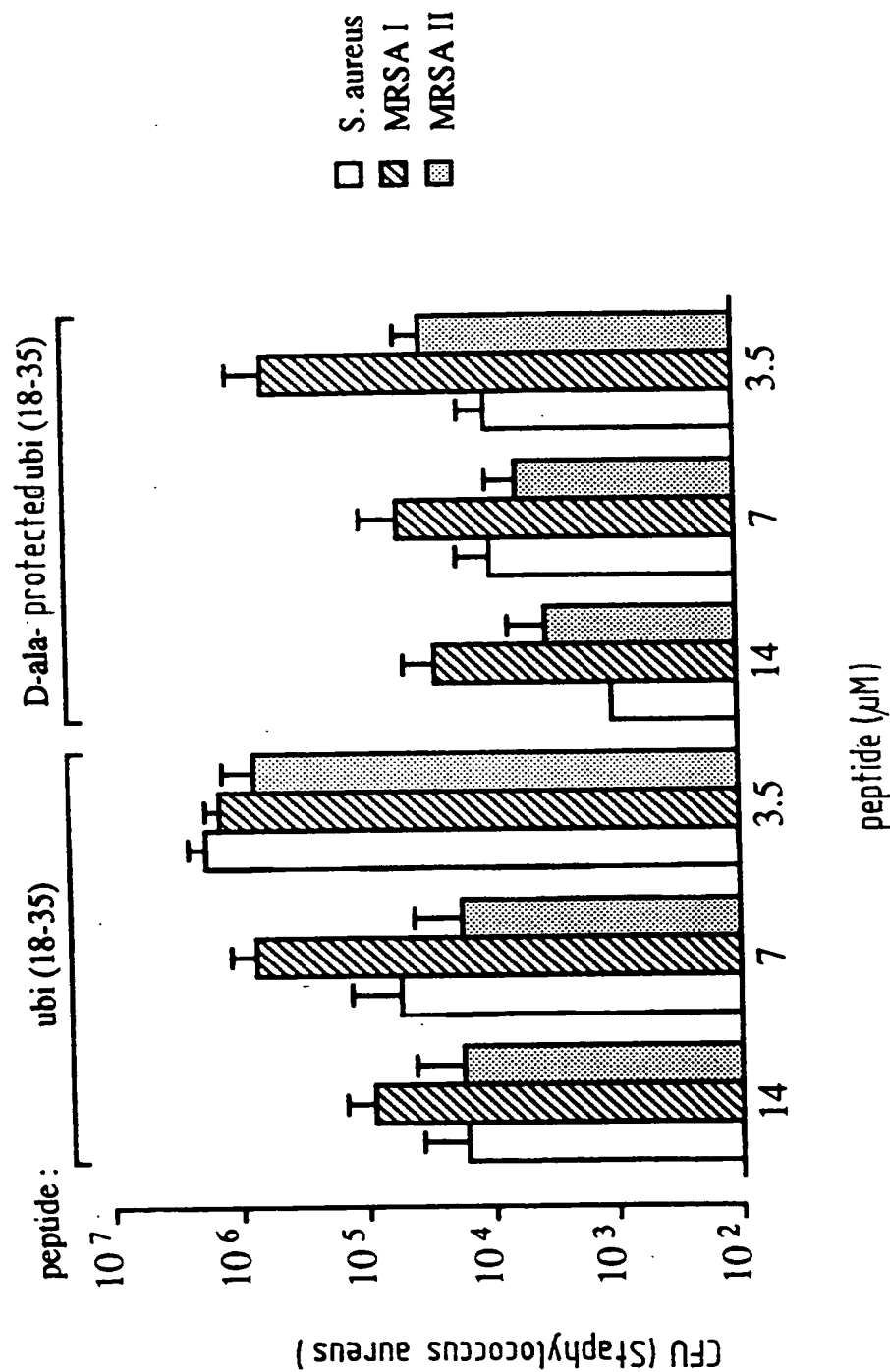


FIG. 8

10/17

Effect of D-ala-protected ubi (18-35) on *E. coli*  
and antibiotic-resistant *E. coli*

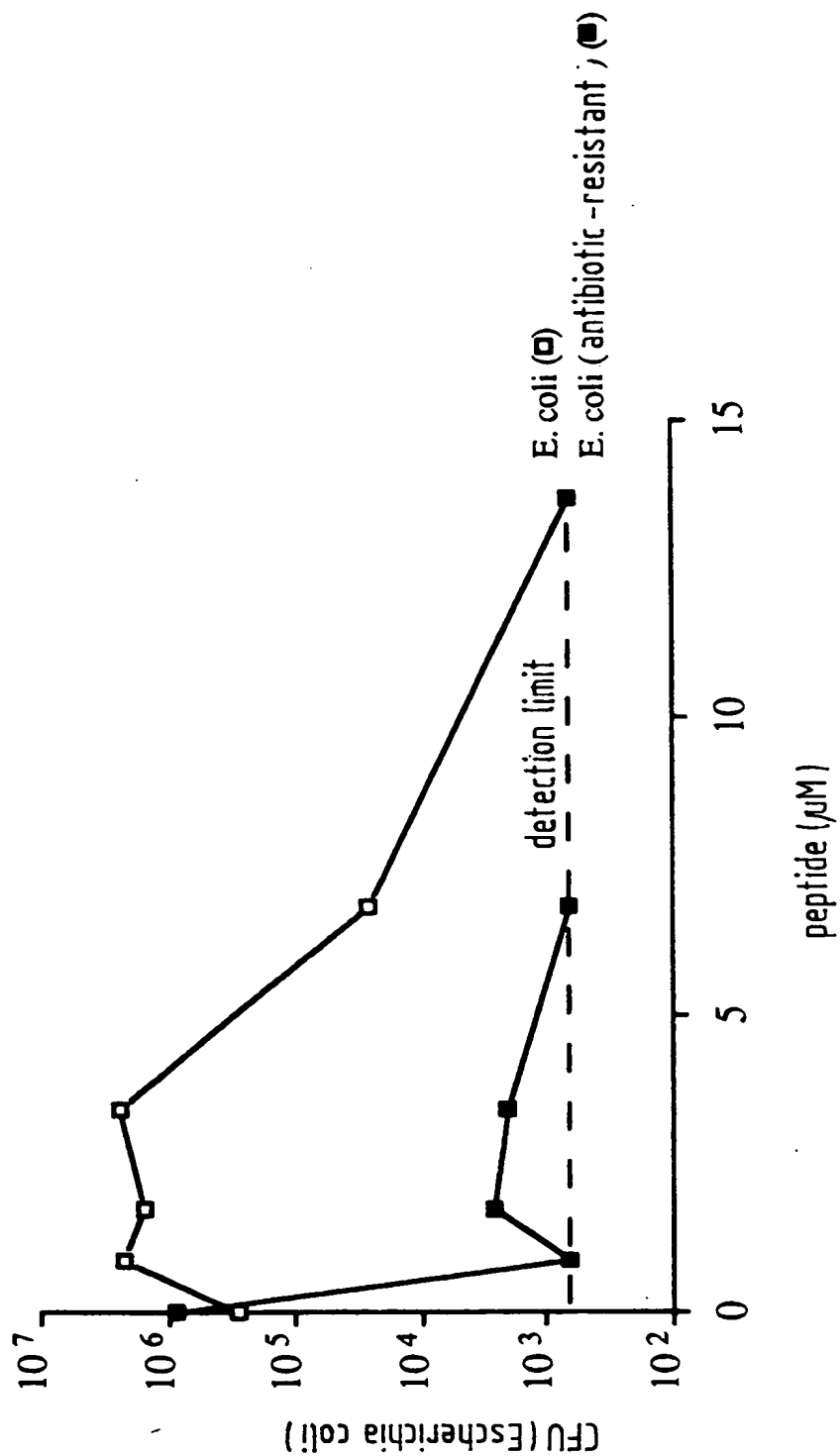
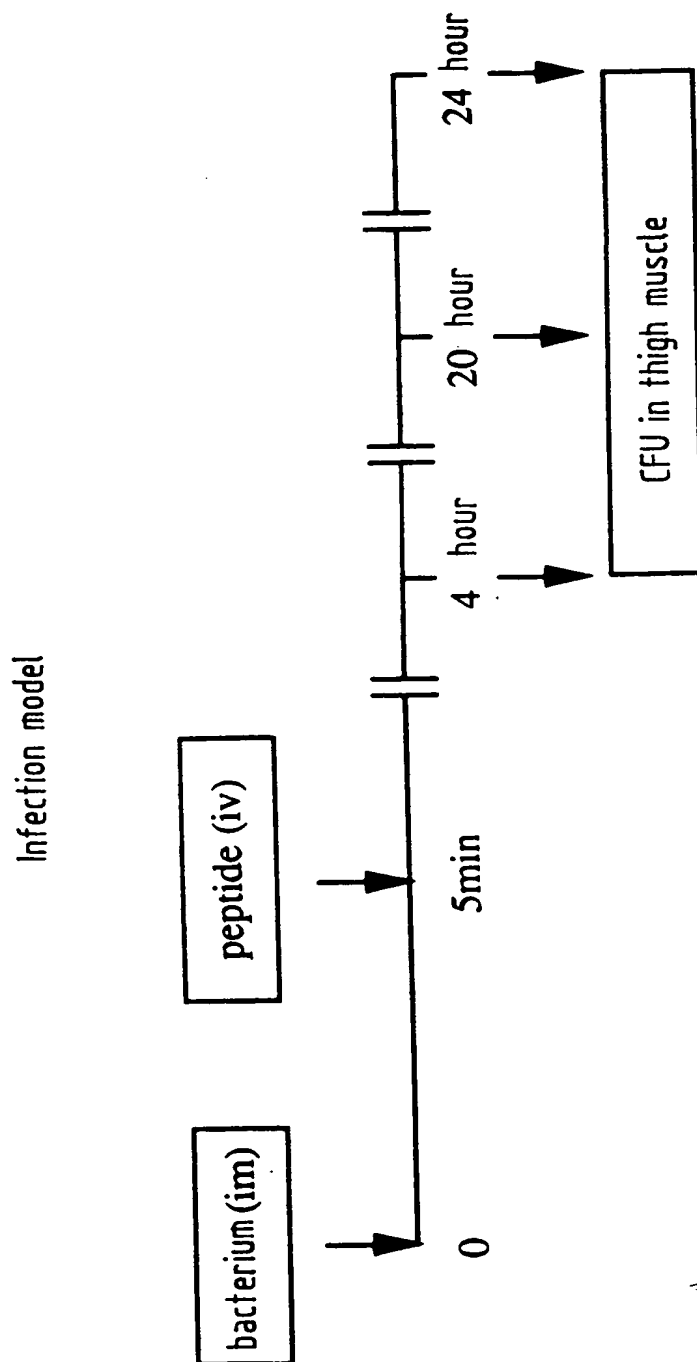


FIG. 9

11/17

FIG. 10



12/17

Accumulation of  $^{99m}\text{Tc}$ -labelled ubiquitin (18-35) in the thigh muscle infected by *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 after intraperitoneal injection

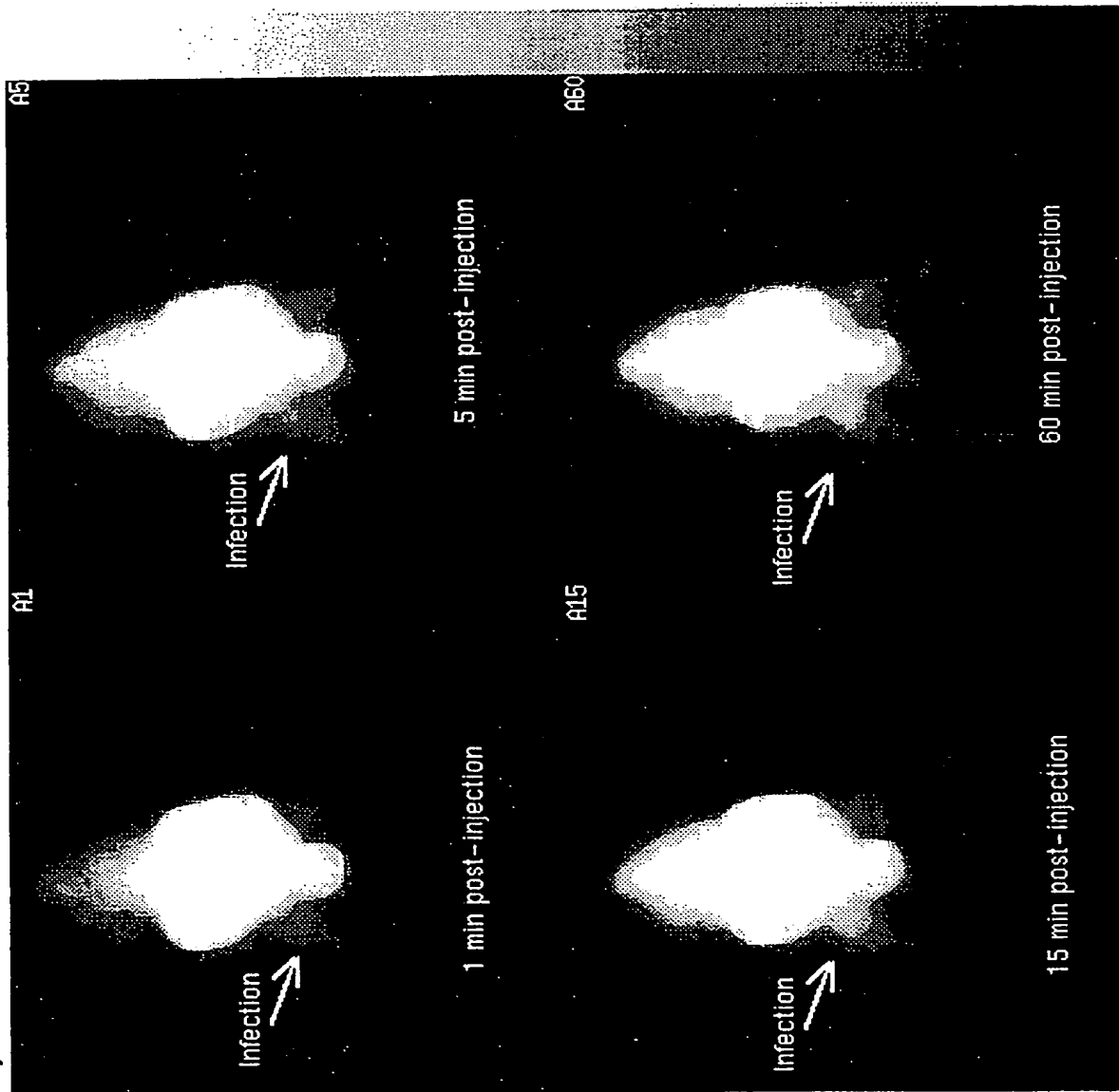


FIG. 11

13/17

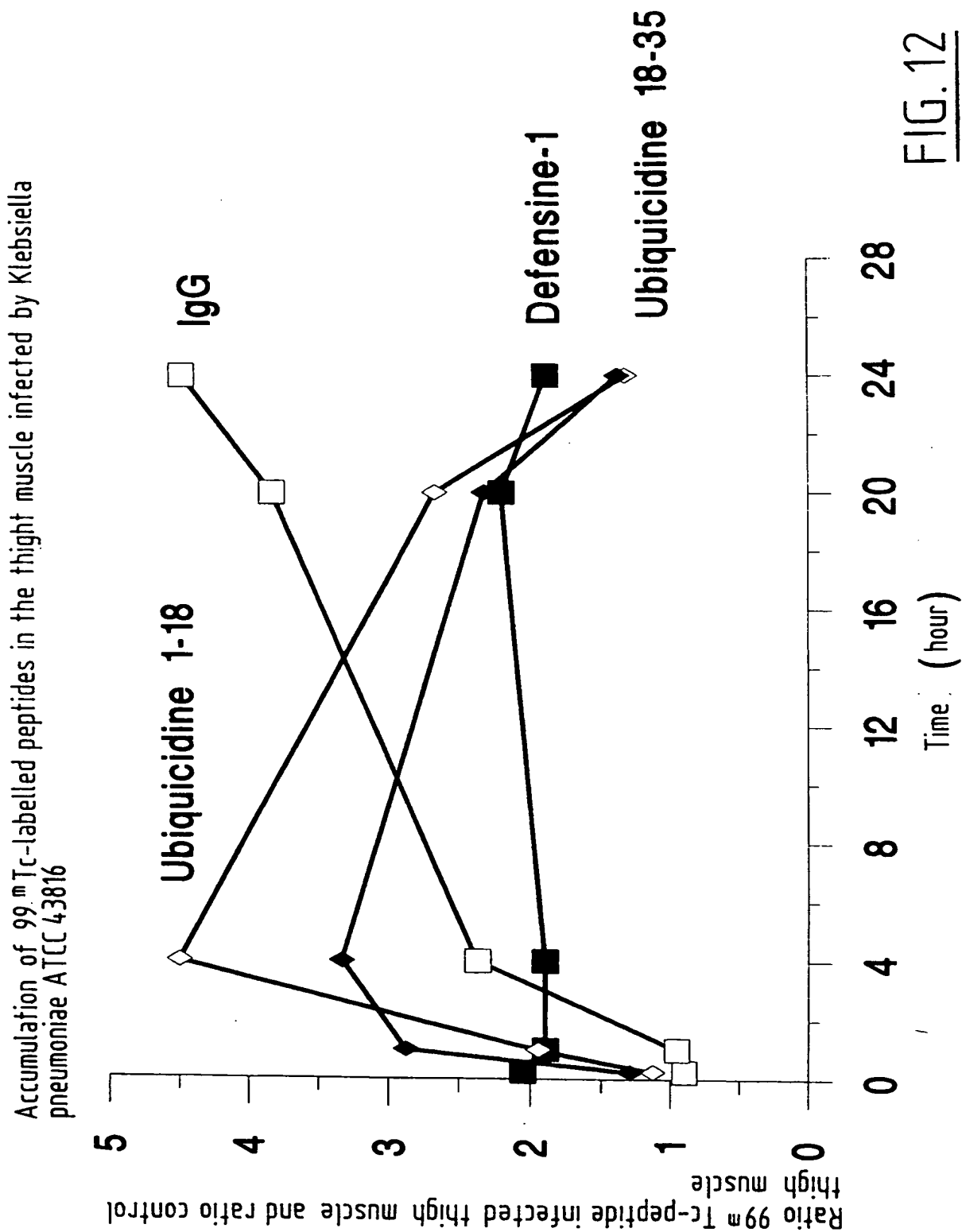
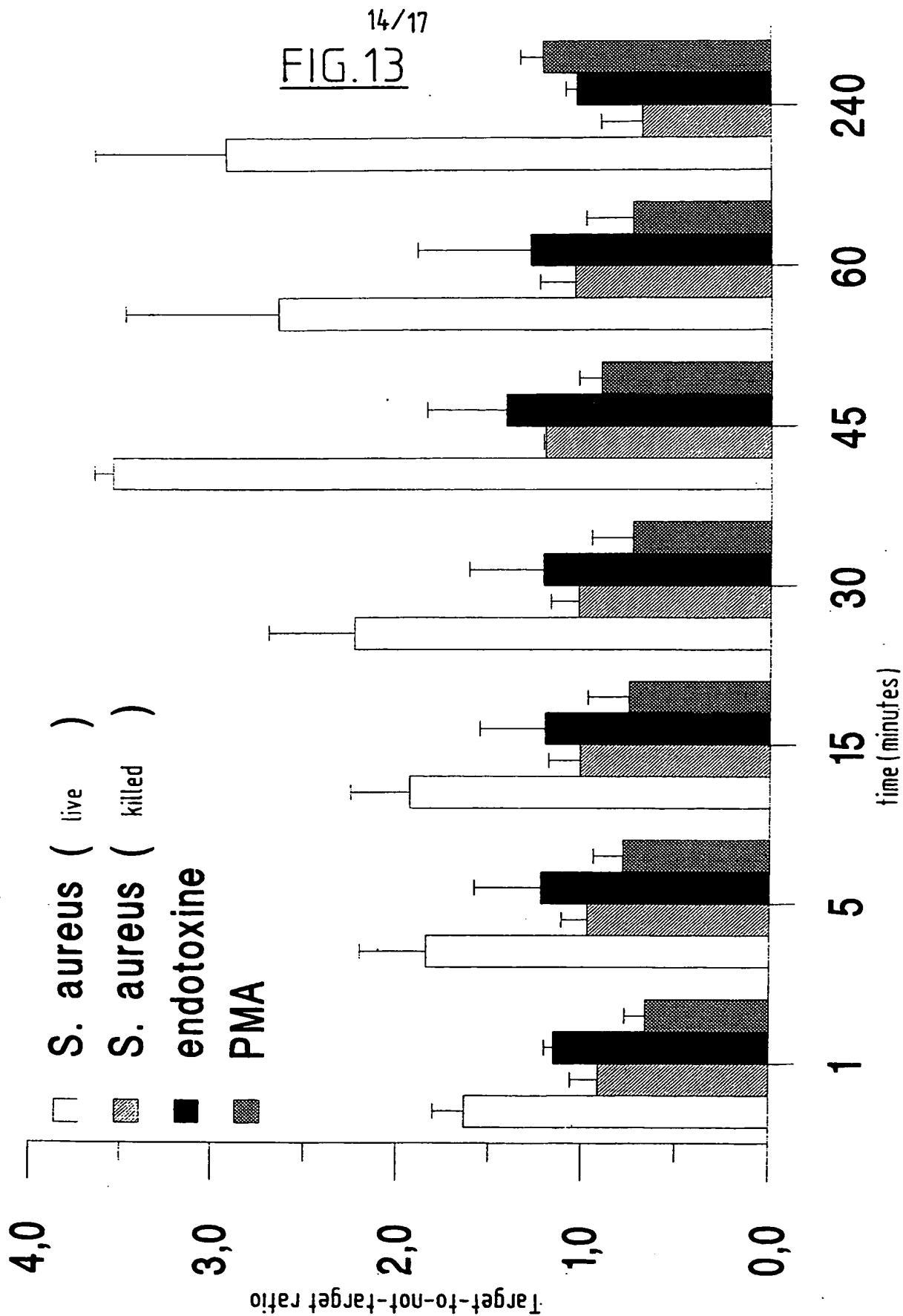
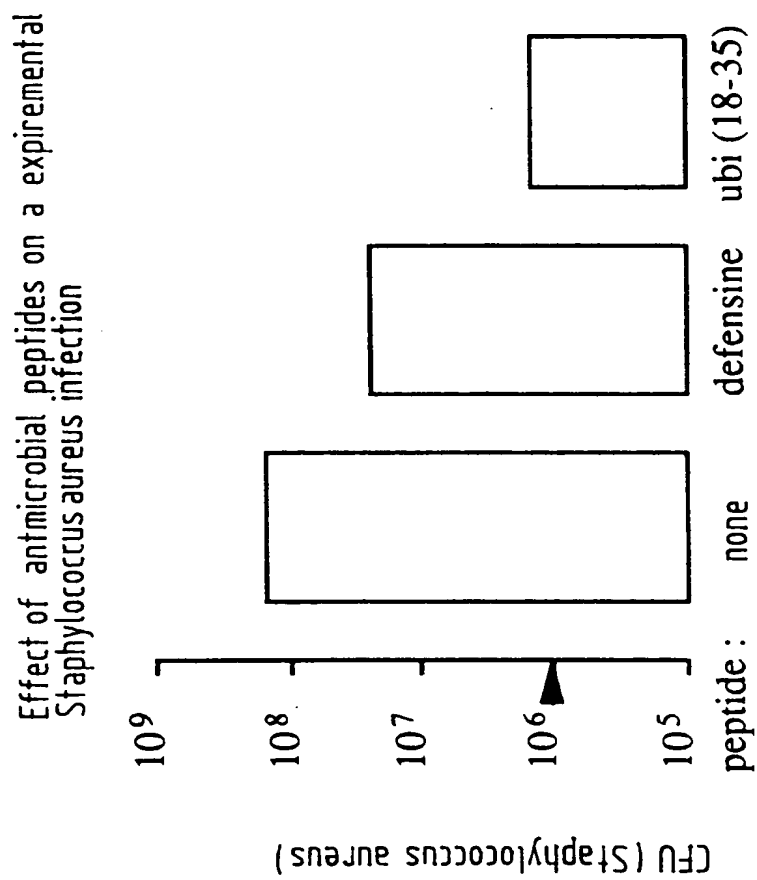


FIG. 12

Accumulation of 99 Tc-labelled ubiquitinidine 18-35 in an infection but not in inflammations



15/17

FIG. 14A

16/17

Effect of antimicrobial peptides on an experimental *Klebsiella pneumoniae* infection

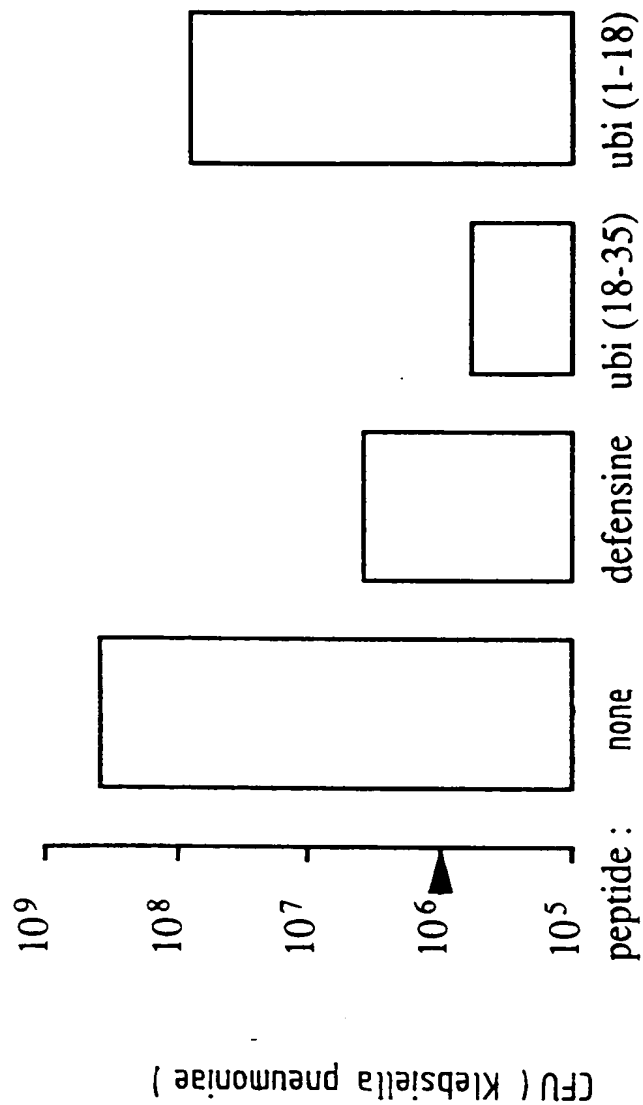
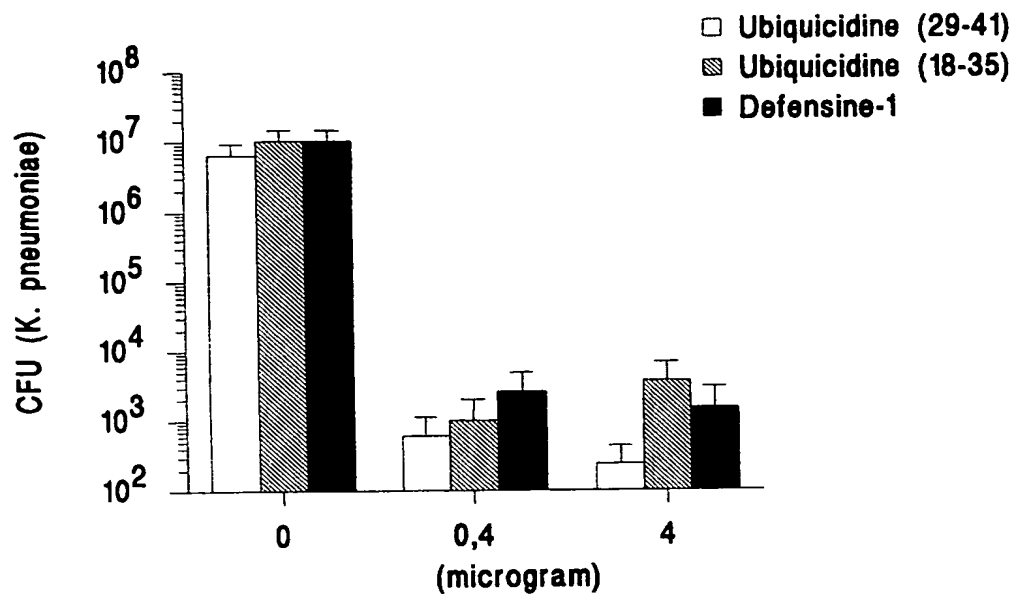


FIG. 14B

17/17

Antimicrobial effect of ubiquidine 29-41 and 18-35 and defensin-1  
in mice



Antimicrobial effect of ubiquidine 29-41 and 18-35 and defensin-1  
in mice treated with cyclofosfamide

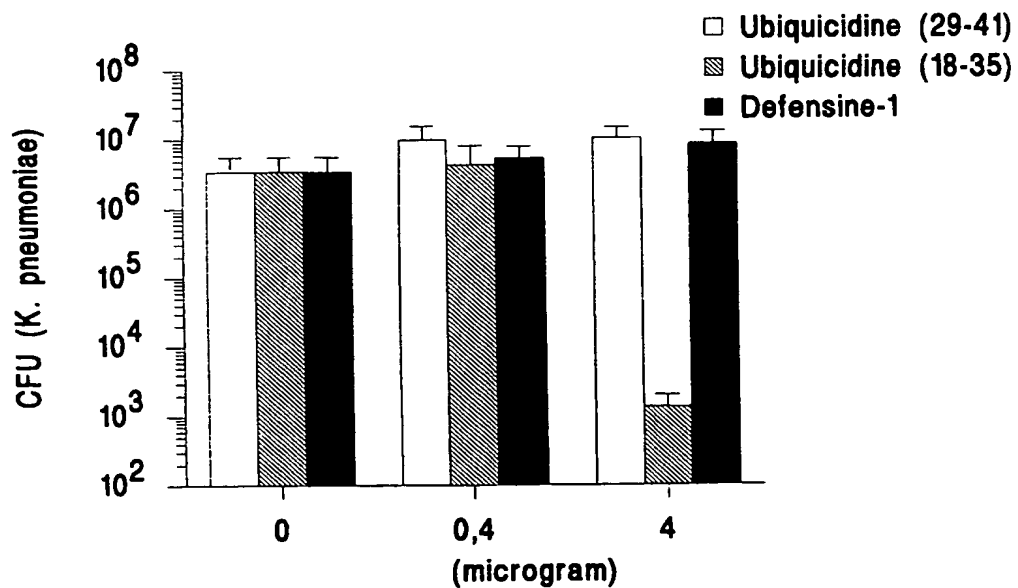


FIG.15

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

onal Application No

PCT/NL 98/00311

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/11 C07K14/00 C07K14/47 G01N33/68 A61K51/08  
A61K38/04

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	K KAS ET AL.: "Genomic structure of the human fau gene: encoding the ribosomal protein S30 fused to a ubiquitin-like protein" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS., vol. 187, no. 2, 16 September 1992, pages 927-933, XP002052804 ORLANDO, FL US see the whole document --- -/--	24

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 October 1998

Date of mailing of the international search report

22/10/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/NL 98/00311

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	C A NELSON ET AL.: "Identification of the naturally processed form of hen egg white lysozyme bound to the murine major histocompatibility complex class II molecule I-Ak" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 89, no. 16, 15 August 1992, pages 7380-7383, XP002052805 WASHINGTON US see table 1	2,14,17
X	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 124, no. 23, 3 June 1996 Columbus, Ohio, US; abstract no. 314576, XP002052806 see abstract & W M RIDGWAY ET AL.: "Breaking self-tolerance in nonobese diabetic mice" J. EXP. MED., vol. 183, no. 4, 1996, pages 1657-1662,	2,14,17
X	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 5, 31 January 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 52437, G MALCHEREK ET AL.: "natural peptide ligand motifs of two HLA molecules associated with myasthenia gravis" XP002052807 see abstract & INT. IMMUNOL., vol. 5, 1993, pages 1229-1237,	2,14,17
X	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 10, 8 March 1993 Columbus, Ohio, US; abstract no. 87609, XP002052808 see abstract & JP 04 300839 A (NISSHIN FLOUR MILLING CO.) 23 October 1992	2,14,17
A	--- WO 91 16076 A (MALLINCKRODT) 31 October 1991 see the whole document -----	22,23



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/NL 98/00311

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9116076 A	31-10-1991	AT 170757 T	15-09-1998
		AU 653153 B	22-09-1994
		AU 7799891 A	11-11-1991
		CA 2080685 A	18-10-1991
		DE 69130182 D	15-10-1998
		EP 0639082 A	22-02-1995
		US 5268163 A	07-12-1993
<hr/>			

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

REC'D 07 JUL 1999

WIPO PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference L/TL86/1	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/NL98/00311	International filing date (day/month/year) 29/05/1998	Priority date (day/month/year) 29/05/1997
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N15/11		
Applicant RIJKSUNIVERSITEIT LEIDEN et al.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.



2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

- ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 5 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand  11/12/1998	Date of completion of this report  05.07.99
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0 Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Authorized officer  Deck, A  Telephone No. (+49-89) 2399 8432 

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/NL98/00311

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of *(substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

**Description, pages:**

1-22 as originally filed

**Claims, No.:**

1-26 as received on 09/06/1999 with letter of 09/06/1999

**Drawings, sheets:**

1/15-15/15 as originally filed

**2. The amendments have resulted in the cancellation of:**

- ☐ the description, pages:  
☐ the claims, Nos.:  
☐ the drawings, sheets:

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

**4. Additional observations, if necessary:**

**see separate sheet**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/NL98/00311

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

**1. Statement**

---

Novelty (N)	Yes: Claims 1-26
	No: Claims
Inventive step (IS)	Yes: Claims 1-26
	No: Claims
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims 1-26
	No: Claims

**2. Citations and explanations**

**see separate sheet**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

---

International application No. PCT/NL98/00311

Concerning section V:

~~The use of ubiquidine or fragments thereof (claim 1) for the preparation of a drug for the treatment, diagnostics or prophylaxis of infections has been neither described nor suggested in the prior art.~~

The peptide fragments derived from ubiquidine and their use (claims 2-23), and the method for their preparation (claim 26) have not been described either.

The method of labelling a peptide (claims 24-25) has not been described.

Therefore, the present application meets the requirements of novelty, inventive step and industrial applicability defined in Article 33 PCT.

Concerning section I.4.:

For the assessment of the present claims 1, 15-23 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT. The examination has been based on the criteria applied by the EPO.

# CLAIMS

1. Use of ubiquicidine or optionally modified peptide fragments derived therefrom for the preparation of a drug for the treatment, diagnostics or prophylaxis of infections in humans and animals.

5 2. Peptide fragment derived from ubiquicidine and comprising a preferably continuous series of at least 3, preferably at least 8 amino acids from the amino acid sequence of ubiquicidine:

10 KVGHSLARAGKVRGQTPKVAKQEKKKKKTGRAKRRMQYNRRFVNVPVPTFGKKKGPNANS.

3. Peptide fragment as claimed in claim 2 with one of the following amino acid sequences:

	ubiquicidine (1-18)	KVGHSLARAGKVRGQTPK
	ubiquicidine (29-41)	TGRAKRRMQYNRR
15	ubiquicidine (18-29)	KVAKQEKKKKKT
	ubiquicidine (18-35)	KVAKQEKKKKKTGRAKRR
	ubiquicidine (29-35)	TGRAKRR
	ubiquicidine (42-59)	FVNVPVPTFGKKKGPNANS
	ubiquicidine (36-41)	MQYNRR

20 4. Derivative of ubiquicidine or of a peptide fragment as claimed in claim 2 or 3, which derivative has an amino acid sequence which is at least partly the reverse of the amino acid sequence of the corresponding original peptide (fragment) (so-called "(partial) reverse peptide").

5. Derivative of a ubiquicidine or of a peptide fragment as claimed in claim 2, 3 or 4, wherein at least one of the amino acids from the original peptide (fragment) is replaced by a stereoisomer of that amino acid.

30 6. Derivative of ubiquicidine or of a peptide fragment as claimed in claims 2-5, wherein the original amino acid chain is extended at one or both ends thereof with one or more groups, such as D-amino acids, protecting against degradation.

35 7. Derivative as claimed in claim 6 with the amino acid sequence:

D-A--KVAKQEKKKKKTGRAKRR--D-A  
in which D-A represents D-alanine.

8. Hybrid molecule, comprising a cationic peptide with an antimicrobial action and/or a peptide fragment as  
5 claimed in claim 2 or 3 and/or a derivative thereof as claimed in claims 4-7, and one or more effector molecules.

9. Hybrid molecule as claimed in claim 8, wherein the effector molecule comprises an amino acid chain which  
10 is capable of binding to a micro-organism and/or substances secreted by micro-organisms or expressed on the surface thereof.

10. Hybrid molecule as claimed in claim 8, wherein the effector molecule is an endotoxin-binding peptide.

11. Hybrid molecule as claimed in claim 8, wherein  
15 the effector molecule is a detectable label.

12. Hybrid molecule as claimed in claim 11, wherein the detectable label is a radionuclide chosen from the group consisting of technetium 99m (Tc-99m), iodine 123  
20 (I-123) and 131 (I-131), bromine 75 (B-75) and 76 (B-76), lead 203 (Pb-203), gallium 67 (Ga-67) and 68 (Ga-68), arsenic 72 (As-72), indium 111 (In-111), 113m (In-113m) and 114m (In-114m), ruthenium 97 (Ru-97), copper 62 (Cu-62), 64 (Cu-64) and 67 (Cu-67), iron 52 (Fe-52),  
25 manganese 52m (Mn-52m), chromium 51 (Cr-51), rhenium 186 (Re-186) and 188 (Re-188), terbium 161 (Tb-161), yttrium 90 (Y-90), fluorine 19 (F-19), sodium 23 (Na-23), phosphorus 31 (P-31), gadolinium 157 (Gd-157), manganese 55 (Mn-55), dysprosium 162 (Dy-162), chromium 52 (Cr-52) and  
30 iron 56 (Fe-56).

13. Hybrid molecule as claimed in claim 8, wherein the cationic peptide with antimicrobial activity is  
chosen from  $\alpha$ - and  $\beta$ -defensins, ubiquicidine, protegrins, serprocidins, magainins, PR-39, cecropins.

14. Peptide fragments as claimed in claim 2 and 3  
35 for use in the diagnostics, prophylaxis or therapy of infections in humans and animals.

15. Derivatives as claimed in claims 4-7 for use in the diagnostics, prophylaxis or therapy of infections in  
40 humans and animals.

16. Hybrid molecules as claimed in claims 8-13 for use in the diagnostics, prophylaxis, therapy or monitoring of infections in humans and animals.

17. Peptide fragments as claimed in claim 14, derivatives as claimed in claim 15 or hybrid molecules as claimed in claim 16, wherein the microbial infections are caused by pathogenic Gram-positive (Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes including antibiotic-resistant strains of S.aureus (also called Multidrug Resistant S.aureus (MRSA)) and Gram-negative ((antibiotic-resistant) Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, enterococci and Salmonella typhimurium) bacteria, micro-organisms difficult to treat, such as Mycobacterium avium and Mycobacterium fortuitum, fungi, such as Candida albicans, Cryptococcus neoformans and Aspergillus fumigatis, viruses, in particular enveloped viruses, and parasites, such as Trypanosoma cruzi and Toxoplasma gondii.

18. Antimicrobial agent, comprising at least a suitable quantity of one or more active components chosen from ubiquicidine, peptide fragments as claimed in claims 2 and 3, derivatives as claimed in claims 4-7, hybrid molecules as claimed in claims 8-13, optionally in the presence of one or more suitable excipients.

19. Antimicrobial agent as claimed in claim 18 for use in therapy and prophylaxis in humans and animals.

20. Diagnostic agent, comprising a suitable quantity of one or more active components provided with a detectable label and chosen from ubiquicidine, peptide fragments as claimed in claims 2 and 3, derivatives as claimed in claims 4-7, hybrid molecules as claimed in claims 8-13.

21. Diagnostic agent as claimed in claim 19 for use in diagnostics and monitoring.

22. Method for labelling a cationic peptide with antimicrobial action, comprising of placing the peptide for labelling in contact with a tin(II) salt, a borohydride and a radioactive label in the presence of alkali, wherein the peptide is modified with MAG3 (mercapto-acetyl glycine-glycine-glycine).



23. Method as claimed in claim 22, wherein the tin(II) salt and the borohydride are respectively tin(II)pyrophosphate and sodium borohydride or potassium borohydride, which are used in a ratio between 1:1 and 5 1:10, preferably 1:4, in quantities of respectively 0.5-5  $\mu$ l and 2-10  $\mu$ l, wherein the radioactive label is a standard solution of  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetate or  $^{186}\text{Re}$ -perrhenate in a quantity of 0.05-0.5 ml, preferably 0.1 ml, wherein the 10 alkali is sodium hydroxide and the alkali concentration is 0.5-5 M, preferably 0.1 M, and wherein the whole is stirred for 1 to 60 minutes, preferably 5 to 30 minutes at a temperature between room temperature and 40°C, and preferably at about 37°C.

24. Method for preparing ubiquicidine, peptide 15 fragments as claimed in claims 2 and 3, derivatives as claimed in claims 4-7, hybrid molecules as claimed in claims 8-13 by transforming an animal egg-cell with a gene construct which codes for the ubiquicidine, peptide fragment, derivative or hybrid molecule, regenerating a 20 transgenic animal from the transformed egg-cell and isolating the ubiquicidine, peptide fragment, derivative or hybrid molecule from a tissue or bodily fluid of the animal, for instance milk.

\*\*\*\*\*